

UNIVERSIDAD NACIONAL DE MAR DEL PLATA

TESIS DOCTORAL

---

**Estudio fisiológico de las defensas  
antioxidantes de los camarones  
penaeoideos**

---

*Tesista:*

Lic. María Laura ESPINO

*Director:*

Dra. Ana Cristina DÍAZ

Grupo de Investigación Acuicultura

Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras

UNMDP - CONICET

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

22 de diciembre de 2017

UNIVERSIDAD NACIONAL DE MAR DEL PLATA

## *Resumen*

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras

UNMDP - CONICET

Doctorado en Ciencias: Área Biología

**Estudio fisiológico de las defensas antioxidantes de los camarones penaeoideos**

por Lic. María Laura ESPINO

El objetivo general de esta Tesis Doctoral fue estudiar los efectos de la incorporación compuestos bioactivos como ingredientes funcionales, tales como polisacáridos algales y/o carotenoides, en la dieta y de la variación de la salinidad sobre la fisiología del langostino *Pleoticus muelleri* y/o el camarón *Artemesia longinaris* expuestos a un compuesto nitrogenado altamente tóxico como es el nitrito.

Se evaluó la influencia de la salinidad en la toxicidad del nitrito sobre *P. muelleri*; para ello, animales aclimatados a 33; 30 y 25 de salinidad fueron expuestos a concentraciones crecientes de nitrito (0 a 1500 mg/l) en un ensayo de toxicidad aguda. Luego de las 96 hs de exposición, la concentración letal media ( $LC_{50}$ ) fue de 170,56; 50,93 y 6 mg/l de nitrito para los langostinos mantenidos a 33; 30 y 25 de salinidad, respectivamente. El análisis de los tejidos branquial y hepatopancreático reveló que las alteraciones causadas por el nitrito ambiental se acentúan con el incremento de su concentración; para las branquias las principales histopatologías fueron hiperplasia y plegamiento de la cutícula, y en el caso del hepatopáncreas, deterioro del epitelio tubular y la vacuolización del citoplasma de las células R y F y un incremento del número de células B. El estudio de la actividad antioxidante demostró la capacidad protectora del tejido hepatopancreático en todos los tratamientos, evidenciada por su reacción con el radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH). De los metabolitos estudiados (proteínas, glucosa, colesterol y triglicéridos), sólo la glucosa mostró variaciones significativas ante la disminución de la salinidad. Los resultados de este capítulo permiten inferir que en condiciones hiposmóticas *P. muelleri* es más susceptible a la exposición a nitrito, pero es capaz de disminuir los efectos del estrés oxidativo incrementando la actividad del sistema de defensas antioxidantes.

Otro aspecto de este estudio fue determinar la interacción entre la incorporación de astaxantina en la dieta de postlarvas de *P. muelleri* y la presencia de nitrito ambiental. En este caso se utilizaron postlarvas que fueron alimentadas durante 30 días con tres dietas isoproteicas e isolipídicas conteniendo 0; 100 y 300 mg de astaxantina/kg de dieta ( $C_0$ ;  $C_{100}$  y  $C_{300}$ , respectivamente). Todas las postlarvas de cada tratamiento fueron expuestas a diferentes concentraciones de nitrito (0-80 mg/l), en un ensayo estático de toxicidad aguda. Los valores de  $LC_{50}$  a las 96 horas al nitrito fueron 76,33; 89,70 y 156,96 mg/l para los langostinos provenientes de los tratamientos  $C_0$ ;  $C_{100}$  y



C<sub>300</sub>, respectivamente. En todos los tratamientos con nitrito los ejemplares mostraron alteraciones tisulares comparados con la condición histológica control. La principal histopatología en el hepatopáncreas fue la retracción del epitelio dentro de la capa laminar de tejido conectivo que rodea a cada túbulo y en algunos túbulos se observó una reducción en el número y tamaño de las vacuolas de reserva lipídicas. La adición de astaxantina (C<sub>300</sub>) disminuyó la toxicidad del nitrito, la estructura general del hepatopáncreas fue menos afectada que la muestra sin astaxantina (C<sub>0</sub>). En las branquias, se observó deterioro del tejido a 40 mg/l de nitrito. La exposición al nitrito causó edema de las lamelas, desorganización del epitelio y disrupción de la cutícula, lo cual produjo la pérdida de la estructura lineal de la laminilla. Sin embargo, los individuos alimentados con C<sub>300</sub> y expuestos a 40 mg/l de nitrito, no presentan alteraciones en las branquias; los cambios histológicos se observaron a 80 mg/l de nitrito. Para todas las concentraciones de nitrito, los extractos de hepatopáncreas presentaron similares curvas de reacción con el DPPH, la señal decayó entre 34 y 52 % a los 30'. Los efectos de la dosis y el tiempo fueron más evidentes en los langostinos expuestos a 80 mg/l de nitrito; por ello, fue medida y comparada la actividad antioxidante total de los extractos de individuos expuestos a esa concentración de nitrito y alimentados con C<sub>0</sub>; C<sub>100</sub> y C<sub>300</sub>. Todos mostraron capacidad secuestrante de radicales libres, aunque se observaron algunas diferencias en el porcentaje de DPPH remanente entre los animales alimentados con C<sub>0</sub> (43 %) y los alimentados con C<sub>100</sub> y C<sub>300</sub>, los cuales tuvieron una mayor actividad (62 y 59 %, respectivamente). En base a los resultados obtenidos, se puede postular a la astaxantina dietaria como un protector contra el estrés por nitrito en el cultivo de postlarvas de *P. muelleri*.

Respecto del camarón *A. longinaris* se estudió la incorporación del extracto soluble de polisacáridos obtenido del alga parda *Undaria pinnatifida* como aditivo funcional en la dieta. Como primer paso, se realizó el análisis químico del extracto a partir del cual se identificaron los grupos funcionales característicos de los polisacáridos sulfatados, tales como sulfato (O=S=O) y el éster de sulfato (S=O) propios del fucoidan de las algas pardas. En cuanto a la composición en monosacáridos, los más abundantes fueron el manitol, seguido de la fucosa y la galactosa; el contenido de estos últimos corresponde a un 17,4 % de fucoidanos. Se determinó la presencia de

sustancias protectoras en el extracto por su capacidad antioxidante al reaccionar con el radical DPPH, la concentración del radical disminuyó al incrementar el tiempo de reacción, hasta alcanzar un 50 % de DPPH a los 18 minutos. A partir de estos resultados, se evaluó su utilización como componente dietario en *A. longinaris*. Se diseñaron cuatro dietas conteniendo 0; 1; 2 y 3 % (control, U1; U2 y U3, respectivamente) del extracto soluble. Luego de 30 días de experimentación los porcentajes de incremento en peso medio de los camarones fueron significativamente más altos para las dietas adicionadas con el extracto de *U. pinnatifida* que los alimentados con la dieta control. La digestibilidad aparente de las proteínas disminuyó significativamente para las dietas U2 y U3. Sin embargo, el estudio de las variables hemolinfáticas determinó que no existe correlación entre la concentración de los metabolitos analizados y la concentración del aditivo dietario. En cuanto a la capacidad antioxidante del tejido hepatopancreático, todos los tratamientos mostraron actividad antioxidante evidenciada por su habilidad para reaccionar con el DPPH; los homegenatos de los individuos alimentados con U1 y U2 presentaron mayor actividad antioxidante que aquellos alimentados con la dieta control y U3. Como último paso, se evaluó los efectos de las dietas U2 y U3 sobre la toxicidad aguda del nitrito, a través de la determinación de la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD). Como control se utilizaron animales alimentados con dietas sin aditivo. Transcurridas las 4 semanas de alimentación, se realizó un ensayo estático de toxicidad aguda al nitrito. Las  $LC_{50}$  a las 96 hs fueron 650,84; 725,24 y 493,57 mg/l para los tratamientos control, U2 y U3, respectivamente. En concordancia con este resultado, la actividad de SOD fue mayor para los camarones alimentados con U2. Finalmente, la adición de un 2 % de extracto soluble de polisacáridos obtenido del alga parda *U. pinnatifida* en la dieta del camarón *A. longinaris* es recomendada para mejorar la tolerancia al nitrito ambiental, a través del incremento de la actividad antioxidante.

Los resultados obtenidos en la presente Tesis aportan información relevante para el cultivo de las especies autóctonas de camarones peneidos, *Pleoticus muelleri* y *Artemesia longinaris*. Las hipótesis planteadas sobre el aumento de la tolerancia al nitrito en condiciones hiperosmóticas y la suplementación de las dietas con astaxantina y extracto de polisacáridos de *U. pinnatifida*, han sido corroboradas. Estos hallazgos

destacan la necesidad de monitorear la salinidad del agua de cultivo y formular dietas adicionadas con ingredientes funcionales para afrontar situaciones de estrés.



## *Agradecimientos*

A mis padres, Josefina y Maximiliano por la confianza y el apoyo que me han brindado durante toda mi carrera, escuchándome y guiándome.

A mi hija Emma, por acompañarme y siempre estar feliz a mi lado “visitando a mis bichis”.

A mi pareja, Edwin por recorrer junto a mi este último trayecto con paciencia y amor.

A todos los miembros del grupo de investigación de Acuicultura, en especial a mi directora: Dra. Ana Cristina Díaz y a la Lic. María Susana Velurtas por responder a mis necesidades brindándome su tiempo y experiencia.

Al Dr. Fenucci por su confianza y preocupación por mi trabajo.



# Índice general

<b>Resumen</b>	<b>III</b>
<b>Agradecimientos</b>	<b>IX</b>
<b>Índice de figuras</b>	<b>XV</b>
<b>Índice de tablas</b>	<b>XVII</b>
<b>1. Introducción general</b>	<b>1</b>
1.1. Generalidades . . . . .	1
1.2. Estudios previos . . . . .	4
1.3. Nutrición . . . . .	5
1.4. Estrés oxidativo . . . . .	8
1.5. Variables ambientales . . . . .	9
1.6. Planteo específico del tema de tesis . . . . .	11
1.6.1. Hipótesis . . . . .	13
1.6.2. Objetivos . . . . .	13
<b>2. Influencia de la salinidad sobre la toxicidad del nitrito</b>	<b>15</b>
2.1. Introducción . . . . .	15
2.2. Toxicidad aguda al nitrito . . . . .	18
2.2.1. Materiales y métodos . . . . .	18
2.2.1.1. Determinación de la $LC_{50}$ . . . . .	18
2.2.1.2. Análisis histológico . . . . .	19
2.2.1.3. Actividad antioxidante total . . . . .	19
2.2.1.4. Análisis estadístico . . . . .	21
2.2.2. Resultados . . . . .	21

2.3. Influencia de la salinidad sobre la toxicidad del nitrito . . . . .	26
2.3.1. Materiales y métodos . . . . .	26
2.3.1.1. Ensayo de toxicidad aguda . . . . .	26
2.3.1.2. Actividad antioxidante total (AT) . . . . .	27
2.3.1.3. Análisis de variables metabólicas . . . . .	27
2.3.1.4. Análisis estadístico . . . . .	28
2.3.2. Resultados . . . . .	28
2.4. Discusión . . . . .	31
<b>3. Efectos de la astaxantina dietaria sobre la tolerancia al nitrito</b>	<b>37</b>
3.1. Introducción . . . . .	37
3.2. Materiales y métodos . . . . .	44
3.2.1. Experimento de alimentación y $LC_{50}$ . . . . .	44
3.2.2. Estudio histológico del hepatopáncreas y las branquias . . . . .	45
3.2.3. Actividad antioxidante total (AT) . . . . .	46
3.2.4. Análisis estadísticos . . . . .	46
3.3. Resultados . . . . .	46
3.4. Discusión . . . . .	51
<b>4. Estudio de la actividad antioxidante del extracto de <i>Undaria pinnatifida</i> y su utilización como aditivo funcional en la dieta de camarones peneidos</b>	<b>57</b>
4.1. Introducción . . . . .	57
4.2. Objetivo . . . . .	64
4.3. Análisis químico del extracto . . . . .	65
4.3.1. Materiales y Métodos . . . . .	65
4.3.1.1. Obtención de extracto soluble de polisacáridos a partir de la harina de <i>Undaria pinnatifida</i> . . . . .	65
4.3.1.2. Análisis del extracto por espectroscopia IR . . . . .	66
4.3.1.3. Determinación de azúcares componentes . . . . .	66
4.3.1.4. Determinación de la Capacidad Antioxidante Total . . . . .	68
4.3.2. Resultados . . . . .	69
4.4. Evaluación de la inclusión del extracto como componente dietario . . . . .	71
4.4.1. Materiales y Métodos . . . . .	71



4.4.1.1.	Obtención de los animales en experimentación . . . . .	71
4.4.1.2.	Experimento de alimentación . . . . .	72
4.4.1.3.	Determinación de las de variables metabólicas . . . . .	73
4.4.1.4.	Digestibilidad aparente . . . . .	73
4.4.1.5.	Actividad antioxidante total . . . . .	73
4.4.1.6.	Análisis estadísticos . . . . .	74
4.4.2.	Resultados . . . . .	74
4.5.	Toxicidad del nitrito en animales alimentados con dietas adicionadas con extracto . . . . .	77
4.5.1.	Materiales y métodos . . . . .	77
4.5.1.1.	Determinación de la $LC_{50}$ (concentración letal media) . . . . .	77
4.5.1.2.	Determinación de las variables metabólicas . . . . .	77
4.5.1.3.	Actividad de enzimas antioxidantes . . . . .	77
4.5.1.4.	Análisis estadísticos . . . . .	78
4.5.2.	Resultados . . . . .	78
4.6.	Discusión . . . . .	79
<b>Consideraciones finales</b>		<b>85</b>
<b>Bibliografía</b>		<b>87</b>



# Índice de figuras

1.1. Producción mundial de la pesca de captura y la acuicultura en el período 1950-2014 (FAO, 2016). . . . .	2
2.1. Cortes transversales de hepatopáncreas de <i>P. muelleri</i> expuestos a nitrito.	23
2.2. Cortes transversales de branquias de <i>P. muelleri</i> expuestos a diferentes concentraciones de nitrito. . . . .	25
2.3. Porcentaje del radical DPPH remanente en función del tiempo en <i>P. muelleri</i> expuestos a nitritos y mantenidos a 33 de salinidad. . . . .	26
2.4. Actividad antioxidante total (AT) en el tejido hepatopancreático de ejemplares de <i>P. muelleri</i> expuestos a nitrito. . . . .	30
3.1. Diagrama esquemático del principal ruta de conversión metabólica desde al $\beta$ -caroteno hasta la astaxantina en el tejido de crustáceos (Wade <i>et al.</i> , 2015) . . . . .	39
3.2. Corte transversal de hepatopáncreas de postlarvas de <i>P. muelleri</i> teñidas con H&E . . . . .	48
3.3. Vista general de las branquias de postlarvas de <i>P. muelleri</i> . . . . .	49
3.4. Cinética de reacción del tejido hepatopancreático con el radical DPPH.	50
3.5. Efectos secuestrante del radical DPPH seguido durante 60 minutos. . .	51
4.1. Modelo de la estructura del fucoïdan según Pankter (Li, Lu <i>et al.</i> , 2008)	60
4.2. Espectro FTIR del extracto de polisacáridos obtenido a partir de la harina del alga parda <i>U. pinnatifida</i> . . . . .	70
4.3. Porcentaje del radical DPPH remanente en función del tiempo para el extracto de polisacáridos de <i>U. pinnatifida</i> . . . . .	71
4.4. Concentración de metabolitos en hemolinfa de <i>A. longinaria</i> alimentados con diferentes dietas. . . . .	75

- 4.5. Cinética de reacción de los homogenato de hepatopáncreas de camarones alimentados con dietas adicionada con el extracto soluble de polisacáridos del alga parda *Undaria pinnatifida* con el radical DPPH. . 76
- 4.6. Actividad de superóxido dismutasa en homogenatos de *A. longinarius* expuestos a concentraciones crecientes de nitrito y alimentados con dieta control y dietas con 2 y 3 gramos de extracto de polisacáridos del alga parda *U. pinnatifida* . . . . . 79

# Índice de tablas

1.1. Composición nutricional recomendada por Akiyama (1992) . . . . .	6
2.1. X-band Espectro de Resonancia Magnética de DPPH . . . . .	20
2.2. Valores de concentración letal media ( $LC_{50}$ ) al nitrito para <i>P. muelleri</i> mantenido a 33 de salinidad . . . . .	21
2.3. Matriz de correlación de las variables metabólicas y la concentración de nitrito ambiental para <i>P. muelleri</i> . . . . .	31
3.1. Composición porcentual de la dieta control. . . . .	45
3.2. Concentración letal media ( $LC_{50}$ ) al nitrito luego de 96 horas de expo- sición, para <i>P. muelleri</i> alimentado con dietas experimentales. . . . .	47
4.1. Composición en monosacáridos (g 100 g <sup>-1</sup> de muestra) del extracto soluble obtenido de <i>Undaria pinnatifida</i> luego de la hidrólisis. . . . .	70
4.2. Ingredientes que componen las dietas. . . . .	72
4.3. Peso promedio inicial, ganancia en peso y tasa de supervivencia de <i>A. longinaris</i> alimentados con dietas que contienen extractos de poli- sacáridos a diferentes concentraciones durante 30 días. . . . .	75
4.4. Coeficientes de digestibilidad aparente de proteínas para <i>A. longinaris</i>	76



## Capítulo 1

# Introducción general

### 1.1. Generalidades

La FAO (2005) define la acuicultura como “El cultivo de organismos acuáticos, incluyendo peces, moluscos, crustáceos y plantas acuáticas, que implica la intervención del hombre en el proceso de cría para aumentar la producción, en operaciones como la siembra, la alimentación, la protección de los depredadores, etc”. En este marco, es inevitable pensar en la necesidad de incrementar los conocimientos sobre los requerimientos nutricionales y ambientales de las especies cultivables. Tal es su importancia que en la Agenda 2030 para el Desarrollo Sostenible, aprobada en septiembre de 2015 por la Asamblea General de las Naciones Unidas, se plantean 17 objetivos entre los cuales se fijan metas relativas a la contribución y la práctica de la pesca y la acuicultura en pro de la seguridad alimentaria y la nutrición en la utilización de los recursos naturales de tal manera que se garantice un desarrollo sostenible en términos económicos, sociales y ambientales (FAO, 2016).

En este contexto, la acuicultura afronta un reto importante: cómo satisfacer las expectativas de aliviar la presión de las flotas pesqueras y, al mismo tiempo, dar respuesta al incremento de la demanda de productos marinos del mercado local e internacional de manera sustentable y amigable medioambientalmente. La oferta mundial per capita de pescado alcanzó un nuevo máximo histórico de 20 kg en 2014, gracias a un intenso crecimiento de la acuicultura, que en la actualidad proporciona la mitad de todo el pescado destinado al consumo humano (fig. 1.1), y a una ligera mejora de

la situación de determinadas poblaciones de peces como consecuencia de una mejor ordenación pesquera (FAO, 2016).

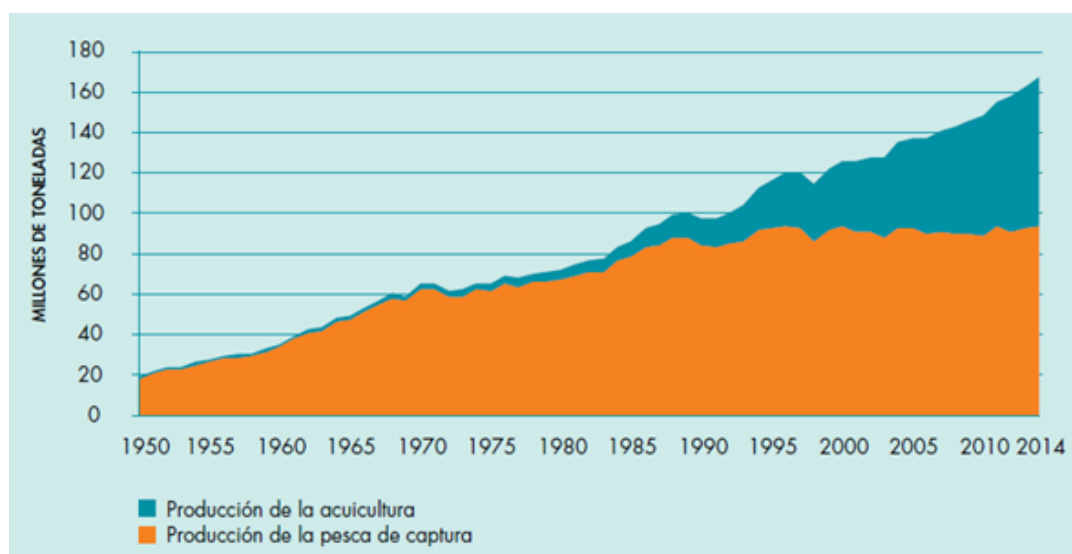


FIGURA 1.1: Producción mundial de la pesca de captura y la acuicultura en el período 1950-2014 (FAO, 2016).

En el litoral argentino se encuentran dos especies de penaeoideos de alto valor comercial, el langostino *Pleoticus muelleri* y el camarón *Artemesia longinaris*. Ambas especies son exclusivas de Sudamérica y tienen un gran potencial para ser cultivadas. Sus áreas de distribución son bastante similares y están determinadas por las aguas templadas-cálidas, brasileñas, que avanzan desde el norte (Vinuesa, 2005), donde las temperaturas oscilan de 8 a 22 °C y la salinidad entre 33 y 36 (Boschi y Gavio, 2005). Específicamente, *P. muelleri* se encuentra desde Río de Janeiro (23°S), Brasil, hasta las costas de Santa Cruz, Argentina (49°45'S) y *A. longinaris* entre Cabo Sao Tomé (22°0,2'S), Brasil, hasta inmediaciones de Isla Leones, en el extremo norte del golfo (45°S) (Vinuesa, 2005). Sin embargo, las mayores concentraciones del langostino se han observado en el golfo San Jorge y litoral de Chubut (Vinuesa, 2005), mientras que *A. longinaris* es más abundante en Mar del Plata, Bahía Blanca y Rawson (Boschi y Gavio, 2005).

Las capturas anuales de estas especies presentan importantes variaciones en sus números, con mínimos en los años 1987 (2.100 toneladas), 1995 (6.200 t) y 2005 (7.400 t) (Bertuche, Fischbach *et al.*, 1996; Bertuche y Fischbach, 1998; Fischbach, De la Garza *et al.*, 2006). Tras esta última crisis, se ha observado una tendencia creciente de las



capturas de langostino, superando año a año los valores anteriores (FAO, 2016). En la temporada del año 2015, se declaró un desembarco de langostino al 28 de enero de 2016 de 142.667,2 toneladas que superó en magnitud a la del año 2014 en algo más al 12 %, constituyendo la tercera temporada consecutiva con desembarcos declarados de langostino superiores a las 100.000 toneladas. Los datos de los últimos desembarques obtenidos en el 2017, muestran el máximo registrado hasta el momento con 197.144 toneladas (Prosdocimi y Monsalvo, 2017). Sin embargo, este aumento en la captura no puede ser explicado sólo como el resultado de una estrategia de explotación. Si bien, la abundancia de langostino ha aumentado sin pausa durante los últimos 10 años, con la información disponible actualmente, es imposible obtener alguna certeza sobre el futuro inmediato de la biomasa disponible. Un escenario posible, de fuerte disminución de su abundancia, provocaría circunstancias de dificultosa administración en la pesquería de langostino patagónico (Fischbach y Bertuche, 2016); la acuicultura sería una posible respuesta.

La acuicultura en Argentina es una actividad poco desarrollada actualmente, pero se estima que tiene un potencial de crecimiento a futuro teniendo en cuenta las necesidades alimentarias y la disminución progresiva de las pesquerías, tanto continentales como marítimas. La preocupación creciente para estimular el desarrollo sostenible (explotación y conservación) de los recursos naturales renovables, ha constituido una nueva vertiente hacia los programas de perfeccionamiento de la acuicultura, que es considerada parte de una gestión integrada de los recursos marino-costeros. Asimismo, existe una gran preocupación por la conservación de la biodiversidad marina, que tiene efecto en las decisiones que se toman a nivel nacional para impulsar la acuicultura. Con el objetivo de promover su desarrollo en el territorio argentino, la ex Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos, (hoy actual Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca), presentó oportunamente un Proyecto al Programa de Servicios Agrícolas Provinciales (PROSAP), que abarca siete provincias del NEA, NOA y Centro del país. Esta propuesta se fortalece con el decreto 692/2017 que aprueba la reglamentación de la Ley N° 27.231, “Desarrollo Sustentable del Sector Acuícola”, la cual tiene por objeto regular, fomentar y administrar, disponiendo

las normativas generales necesarias para su ordenamiento, el desarrollo de la actividad de la acuicultura dentro del territorio de la República Argentina, en concordancia con las atribuciones del Gobierno nacional y de los gobiernos provinciales y municipales.

Los valores de producción acuícola actuales para el país no son aún relevantes, debido probablemente a múltiples causas: los costos de producción, principalmente del alimento, el costo de insumos importados, las limitaciones climáticas que reducen las posibilidades de cría en ciertas áreas donde no se cuenta con temperaturas óptimas para cultivo. El sector productivo considera también como importante limitación la dificultad económica de mejorar la infraestructura (estanques, cámaras de frío), precios de los alimentos, publicidad, etc. En el caso de la acuicultura marina la mayor limitación radica en la escasa inversión en el sector teniendo en cuenta que el Mar Argentino presenta condiciones oceanográficas poco favorables. Sin embargo, se han propuesto las marismas existentes entre Bahía Blanca y San Blas en la Provincia de Buenos Aires y ciertas zonas de la provincia de Río Negro, como áreas aptas para el cultivo de *P. muelleri* y *A. longinarius*, particularmente el langostino.

## 1.2. Estudios previos

Bate (1988) clasificó por primera vez las dos especies de peneidos del Mar Argentino: *Pleoticus muelleri* y *Artemesia longinarius*, realizando una breve reseña de sus características morfológicas; unos años más tarde, Fesquet (1933; 1944a; 1944b) describió con más detalle su organización externa. Debido a su importancia como recurso pesquero en Argentina, en 1954 se iniciaron trabajos de investigación de ambas especies, con observaciones en la región de pesca de Mar del Plata (Angelescu y Boschi, 1959), en el litoral de Chubut (Boschi y Mistakidis, 1966) y el litoral bonaerense (Boschi y Scelzo, 1971). Posteriormente, se realizaron estudios de la pesquería de Bahía Blanca (Wyngaard y Bertuche, 1982) y del litoral patagónico (Boschi, Bertuche *et al.*, 1984; Bertuche, Wyngaard *et al.*, 1986; Bertuche, Hack *et al.*, 1987). Paralelamente, en los años 70' comenzaron las investigaciones, dirigidas por el Dr. Boschi (Scelzo y Boschi, 1975; Boschi y Scelzo, 1979) sobre el cultivo de los camarones peneidos en

la Argentina, logrando el desarrollo larval en acuarios. Más tarde, el grupo de investigación dirigido por el Dr. Fenucci continuó estudiando diversos aspectos del cultivo, analizando el crecimiento en condiciones de laboratorio, con dietas naturales y artificiales preparadas en el laboratorio (Fenucci, Müller *et al.*, 1981; Fenucci 1983). Estos temas fueron profundizados durante la década de los 90'.

En las últimas dos décadas, se comenzaron con estudios de nutrición que involucran desde la composición de la dieta (Spanjersberg *et al.*, 2006; Fenucci, Díaz y Fernández-Gimenez, 2009) hasta los requerimientos nutricionales más detallados como por ejemplo, cuál es la mejor fuente de proteínas (Díaz y Fenucci, 2002), el rol de las vitaminas (Fenucci y Fernández Gimenez, 2004; Fernández Gimenez, Díaz, Velurtas, Petriella *et al.*, 2008), los efectos de la adición de distintos esteroides a la dieta (Harán, Díaz *et al.*, 2013); como también estudios sobre la digestibilidad tanto *in vivo* como *in vitro* de las diferentes dietas formuladas (Fernández Gimenez, Díaz, Velurtas y Fenucci, 2009; Velurtas *et al.*, 2011) y se ha caracterizado la morfología e histología del aparato digestivo, en especial del hepatopáncreas, de ambas especies (Cuartas *et al.*, 2002; Díaz, Sousa *et al.*, 2006).

La importancia de las variables ambientales sobre el estado de salud de estas especies en cultivo, es un aspecto que está adquiriendo una notable atención. Hasta el momento, se ha estudiado los efectos de la temperatura y la salinidad sobre el crecimiento y supervivencia de estas dos especies (Harán *et al.*, 1992). Más recientemente, se han evaluado la influencia de la salinidad sobre la morfología del hepatopáncreas (Cuartas *et al.*, 2003; Masson *et al.*, 2012), donde se detectaron alteraciones significativas del epitelio. Sin embargo, factores como, por ejemplo, la presencia de compuestos tóxicos tales como los productos nitrogenados en el agua aún no ha sido estudiada.

### 1.3. Nutrición

El conocimiento de los requerimientos nutricionales de las especies cultivables de importancia comercial, es imprescindible para la fabricación de piensos utilizados durante todo el ciclo de cría. El estudio de la dieta de los peneidos comenzó en

el año 1955, cuando el investigador Williams analizó por primera vez el contenido estomacal de los camarones de Carolina del Norte, Estados Unidos. En esa oportunidad, se encontró una mezcla de tejido parcialmente digerido y materia orgánica del sedimento junto con fragmentos de crustáceos, anélidos y plantas. Algunos años después, se implementaron otras técnicas, como el uso de radioisótopos de carbono estable (Hughes y Sherr, 1983) e inmunológicas (Hunter y Feller, 1987), que permitieron una identificación más precisa de los ítems alimentarios. Estos estudios fueron efectuados en gran variedad de especies de camarones, y mostraron que en general los peneidos tienen una dieta variada que comprende desde detritos y bacterias hasta vegetales (plantas acuáticas y algas) y pequeños animales (poliquetos, crustáceos, etc.).

Si bien no existe una dieta estándar para los camarones peneidos, luego de varios años de estudio, Akiyama (1992) recomendó la siguiente composición nutricional (Tabla 1.1):

TABLA 1.1: Composición nutricional recomendada por Akiyama (1992)

Nutrientes	Peso de los camarones		
	0-3	3-15	15-40
Proteínas (mínimo)	40	38	36
Lípidos (mínimo-máximo)	6,2-7,2	5,8-6,8	5,5-6,5
Cenizas (máximo)	15	15	15
Colesterol (mínimo)	0,35	0,3	0,25

De manera general, podemos plantear que las distintas especies necesitan nutrientes similares a los reportados para otros animales; sin embargo, desde un punto de vista cuantitativo existen diferencias, en muchos casos muy marcadas, lo que hace recomendable elaborar el alimento basándose en los requerimientos de la especie a la cual se le suministrará (García-Galeano, 1997). En el caso particular de *Pleoticus muelleri* y *Artemesia longinaris*, el porcentaje de proteínas necesario para obtener buenos resultados en cuanto a la supervivencia y ganancia en peso varían entre 56-30 %,

de lípidos 6,9-5,66 %, 2 % de colesterol y 15,51-6,92 % de cenizas (Fenucci, Petriella *et al.*, 1983; Díaz y Fenucci, 2002).

En los últimos años, se está fomentando el uso de diversos aditivos en acuicultura, los cuales incrementan la resistencia al estrés y el crecimiento. Estos compuestos pertenecen a una familia heterogénea considerando sus orígenes (naturales o artificiales), naturaleza química (polisacáridos, enzimas, hormonas, carotenoides, entre otros) y actividad biológica (probióticos, prebióticos, inmunomoduladores). Según el Code of Practice on Good Animal Feeding (FAO, 2001), se considera aditivo a cualquier ingrediente adicionado intencionalmente que no sea normalmente consumido como alimento en sí mismo, y el cual afecta las características del alimento o del producto animal o está encaminado a mejorar el desempeño animal. Una gran variedad de sustancias son adicionadas a las dietas en pequeñas cantidades para impartirles determinadas cualidades como olor, sabor, color, textura, compactación o en general mejorar el desarrollo de los camarones. Entre las primeras, los pigmentos han recibido una especial atención, mientras que la búsqueda de sustancias que estimulen el crecimiento y mejoren la salud del animal, ha sido otro tema de interés para los investigadores (García-Galeano, 1997).

Los carotenoides no sólo son los responsables de la pigmentación de los camarones, además son muy beneficiosos para su salud (Maoka, 2011) debido a que promueven su crecimiento, supervivencia (Wade *et al.*, 2015) y la maduración gonadal de las hembras (Fenucci, Díaz y Velurtas, 2015). Sin embargo, estos animales no son capaces de sintetizarlos *de novo*, por lo tanto deben ser incorporados con la dieta. En este sentido se ha probado que la alimentación de estos animales con dietas suplementadas con carotenoides, mejoran las respuestas al estrés agudo y crónico, relacionados a hipoxia, alteraciones en la salinidad y temperatura e infecciones virales (Wade *et al.*, 2015). Estos efectos parecen vincular la función antioxidante propia de los carotenoides con la mejora de la respuesta antioxidante en los animales, y un mejor rendimiento bajo diversas condiciones estresantes (Wade *et al.*, 2015).

Durante años, las macroalgas se han utilizado en piensos de animales terrestres para reemplazar los ingredientes de origen animal (Leupp *et al.*, 2005). En animales

acuáticos, una gran variedad de algas marinas, incluyendo *Ecklonia maxima*, *Laminaria japonica*, *Ulva rigida*, *Carpoblepharis flaccida*, *Gracilaria gracilis* y *Ulva lactuca*, han sido consideradas como uno de los candidatos más prometedores como fuente alternativa de nutrientes (Alcantara y Noro, 2006; Demetropoulos y Langdon, 2004; Naidoo *et al.*, 2006; Penñaflores y Golez, 1996; Troell *et al.*, 2006; Valente *et al.*, 2006). Aunque el contenido promedio de proteína de las algas marinas es bajo (alrededor del 5-30 % del peso seco), podrían ser útiles como aditivos o suplementos alimenticios en la acuicultura debido a su valor nutricional, disponibilidad y bajo costo (Mustafa y Nakagawa, 1995). Además, se sabe que sus polisacáridos y fibras dietéticas poseen actividades biológicas interesantes, cantidades incomparables de minerales, vitaminas y polifenoles (Burtin, 2003).

#### 1.4. Estrés oxidativo

El oxígeno contenido en el aire que normalmente respiramos es vital para la vida de los organismos aerobios. Sin embargo, alrededor del 5 % del oxígeno respirado, se reduce por mecanismos mono o divalentes a especies parcialmente reducidas y reactivas conocidas como especies reactivas de oxígeno (ROS) y radicales libres (RL) (Halliwell y Gutteridge, 2001); de esta manera, los organismos aeróbicos, están continuamente generando ROS. Los ROS y RL son especies químicas que poseen en el último orbital un electrón no apareado, por lo que son capaces de extraer un electrón de las moléculas vecinas para completar su orbital, convirtiéndose en compuestos altamente reactivos y oxidantes; de ahí que el oxígeno sea una molécula potencialmente tóxica (Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2004).

En condiciones fisiológicas normales, los organismos vivos disponen de una serie de sistemas antioxidantes que neutralizan los ROS y RL. Los mecanismos de defensas antioxidantes están formados por componentes enzimáticos, de los cuales se destacan la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa, y no enzimáticos como el glutatión, la vitamina E, *beta*-carotenos y urea, que actúan como secuestradores de RL de bajo peso molecular (Hargreaves, 1998).

Los organismos interactúan con el medio externo para mantener un ambiente interno que favorezca su supervivencia, crecimiento y reproducción. Sin embargo, el balance neto de esa interacción no siempre es perfecto; la presencia de sustancias tóxicas o patógenos en el entorno causan un desequilibrio bioquímico, conocido como estrés oxidativo, el cual propicia la producción excesiva de ROS y RL que provocan daño oxidativo a las biomoléculas y que no puede ser contrarrestado por los sistemas antioxidantes (Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2004). En acuicultura, la suplementación de las dietas con aditivos antioxidantes o compuesto que promuevan la activación del sistema de defensas antioxidantes, es una posible respuesta a este problema.

Desde el punto de vista comercial, la formulación de la dieta óptima para un organismo se diseña en función del potencial de maximización de su desarrollo corporal (incremento en peso o maduración gonadal). Sin embargo, desde el punto de vista biológico, existen criterios fisiológicos que pueden utilizarse para establecer el efecto de variaciones nutricionales en la calidad del desarrollo. Por lo tanto, es fundamental establecer la relación existente entre la respuesta productiva y la respuesta biológica del organismo (Villarreal, 2002).

## 1.5. Variables ambientales

Las variaciones de salinidad de los océanos son un indicador indirecto, pero potencialmente sensible de varios procesos relacionados con el cambio climático tales como las precipitaciones, la evaporación, la escorrentía fluvial y el derretimiento de los hielos árticos y antárticos. Durante los últimos 50 años se han observado cambios en el índice de salinidad de los océanos, el cual ha aumentado en las regiones donde la evaporación es más intensa, mientras que en las zonas de altas latitudes han mostrado una tendencia decreciente debido a factores como por ejemplo la mayor cantidad de precipitaciones. De Silva y Soto (2012) han hecho una revisión de las repercusiones potenciales de este cambio climático en la acuicultura. La forma de acuicultura continental predominante se desarrolla en estanques de tamaño que oscilan entre unos pocos centenares de metros y algunas hectáreas, y a menudo de

poca profundidad. En el caso de los ponds para el crecimiento y engorde de los crustáceos, la profundidad oscila entre 1 y 1,5 metros; esta característica afecta el mantenimiento de la salinidad de los mismos ante cambios marcados en las condiciones climáticas. El aumento o disminución de la salinidad afecta a los organismos acuáticos influenciando aspectos fisiológicos como la osmorregulación y el consumo de oxígeno y energía.

Como otros invertebrados marinos, los crustáceos son isosmóticos o casi isosmóticos con el agua de mar; por lo tanto, no hay un movimiento importante de agua a través de la superficie de su cuerpo. Este hecho no significa que no gasten nada de energía para mantener la composición de sus fluidos corporales; la hemolinfa, aunque es isosmótica con el medio y generalmente similar en su composición, difiere ligeramente (Lockwood, 1967). En este grupo de organismos están representados todos los patrones posibles de osmorregulación descritos por Prosser (1973) y Venberg y Venberg (1970). Algunos son estenohalinos, es decir que toleran sólo un estrecho rango de concentración osmótica externa y otros son capaces de funcionar en un amplio rango de salinidad ambiental, denominados eurihalinos (Mantel, 1983). Aquellos crustáceos que viven en agua de baja salinidad mantienen su hemolinfa hiperosmótica al medio por transporte activo de sales dentro del cuerpo; la tasa a la cual realizan ese transporte, y consecuentemente la cantidad de trabajo que debe hacerse para regular la concentración, depende del índice de pérdida de iones a través de sus excreciones y la superficie del cuerpo. Este índice de pérdida depende de la permeabilidad a los iones y al agua de la superficie corporal y al gradiente mantenido entre la hemolinfa y el medio. Usualmente, en los organismos marinos la permeabilidad de la superficie es alta, quizás sea porque no es necesaria la impermeabilidad cuando la concentración de la hemolinfa es tan similar al medio (Lockwood, 1967).

A pesar de los múltiples parámetros bioquímicos, morfológicos y fisiológicos que producen los patrones de osmorregulación, el balance de agua y sales es esencialmente gobernado por las leyes de la termodinámica. En un sistema biológico, los movimientos de sales son generados por un gradiente eléctrico y químico a través de una membrana semipermeable y el nitrato presente en el agua de los sistemas de



cultivo intensivo no es la excepción. Los camarones marinos son hiperosmorreguladores a bajas salinidades, hiposmorreguladores a altas salinidades e isosmóticos en agua de mar con una salinidad de 25-30 ppt (Lin, Liou *et al.*, 2000). Cuando son expuestos a nitritos en agua de mar aproximadamente isoosmótica, los camarones acumulan nitrito en la hemolinfa a concentraciones más altas que en el agua ambiental (Chen y Chen, 1992; Chen y Cheng, 1995). Como la captación activa de  $Cl^-$  branquial es presumiblemente limitada en esta situación, la entrada de nitrito puede ser por difusión, y la acumulación se explicaría por un potencial transepitelial positivo que puede mantener la concentración de  $NO_2$  en la hemolinfa por encima de los niveles ambientales (Jensen, 2003).

## 1.6. Planteo específico del tema de tesis

La acuicultura es una actividad que se ha desarrollado en forma exponencial desde la década del 70' y ha evolucionado en forma significativa durante los últimos años. Resulta evidente que en el futuro la producción animal en el medio acuático será una actividad de creciente interés a la que se dedicarán recursos humanos y financieros. Una buena parte del éxito obtenido se debe al importante esfuerzo desarrollado en el campo de la nutrición y alimentación de especies cultivables. La calidad del agua es otro factor muy importante para la reproducción, el crecimiento y la supervivencia de los organismos acuáticos. Por lo tanto la nutrición y las condiciones ambientales de crecimiento (densidad, sustrato, calidad del agua, etc.) determinan la calidad del producto. El objetivo principal en la acuicultura es maximizar el crecimiento y la supervivencia de los animales al mínimo costo, para ello es necesario satisfacer sus necesidades fisiológicas y metabólicas mediante condiciones ambientales y nutricionales adecuadas.

Resulta imprescindible controlar el estado sanitario de los individuos en cultivo; las modificaciones histológicas se detectan mucho más temprano que las diferencias en el crecimiento o supervivencia, sugiriendo que el empleo del análisis histológico constituye un medio práctico para el registro del estado fisiológico y nutricional del individuo, como también para evaluar la calidad del agua. El conocimiento de

las patologías del hepatopáncreas y branquias resulta de utilidad para diagnosticar problemas que se presentan frecuentemente en ambientes contaminados o bajo condiciones controladas y de cultivo. Los compuestos nitrogenados son los tóxicos más comunes en los sistemas de cultivo intensivo, pueden acumularse en el agua como resultado de un desbalance de la actividad de las bacterias nitrificantes. La exposición a estos estresantes puede provocar un amplio rango de alteraciones.

Desde el punto de vista nutricional, se ha demostrado que ciertos aditivos alimentarios, aumentan la capacidad de las defensas antioxidantes en crustáceos como por ejemplo las vitaminas y los carotenoides. Actualmente se orienta la búsqueda hacia nuevos aditivos que actúen también sobre la salud de los animales cultivables. En este sentido las macroalgas pueden constituir una alternativa interesante en virtud de sus propiedades nutritivas, entre las que se encuentran una alta concentración de proteínas, fibras, minerales traza, vitaminas, lípidos, esteroides y aminoácidos. Además de sus componentes nutritivos, las macroalgas contienen compuestos bioactivos de alta capacidad antioxidante, como carotenoides, polifenoles y polisacáridos sulfatados, que pueden ser utilizados para controlar la producción excesiva de radicales libres y las especies reactivas de oxígeno (ROS).

La excesiva producción y/o exposición de un organismo a radicales libres (RL) induce en éste alteraciones biológicas potencialmente conducentes a un daño celular, denominado estrés oxidativo. El estrés oxidativo (EOx) se define como el desequilibrio bioquímico propiciado por la producción excesiva de especies reactivas de oxígeno (ROS) y radicales libres que provocan daño oxidativo en las biomoléculas y que no puede ser contrarrestado por los sistemas antioxidantes. Existen biomarcadores para testear el daño oxidativo sobre las biomoléculas, como por ejemplo los antioxidantes enzimáticos (SOD, CAT, peroxidasas) y no enzimáticos (glutación, vitaminas A, E y C,  $\beta$ -caroteno, urea) (Valavanidis *et al.*, 2006). La peroxidación lipídica es otro importante biomarcador de estrés oxidativo, que mide el grado de injuria tisular a nivel celular y subcelular, ya que afecta a toda estructura compuesta por membranas fosfolipídicas.

### 1.6.1. Hipótesis

Se postularon a los camarones peneidos, *Artemesia longinaris* y/o *Pleoticus muelleri*, como modelos para testear el estrés oxidativo, estudiando la interacción entre los efectos de la exposición a compuestos nitrogenados y distintas condiciones de cultivo. Se examinaron tres hipótesis:

**Hipótesis 1:** La tolerancia al nitrito aumenta en condiciones hiperosmóticas.

**Hipótesis 2:** La tolerancia al nitrito aumenta con la incorporación de carotenoides en la dieta de larvas de *P. muelleri*.

**Hipótesis 3:** La resistencia al estrés aumenta con la incorporación de extracto soluble de polisacáridos algales en la dieta de camarones peneidos.

### 1.6.2. Objetivos

El objetivo general de esta Tesis Doctoral fue estudiar los efectos de la incorporación compuestos bioactivos, tales como polisacáridos algales y/o carotenoides, en la dieta y de la variación de la salinidad sobre la fisiología del camarón *Artemesia longinaris* y/o el langostino *Pleoticus muelleri* expuestos a un compuesto nitrogenado altamente tóxico como es el nitrito.

Objetivos particulares:

1. Determinar la toxicidad aguda del nitrito en individuos aclimatados a diferentes salinidades.
2. Establecer la influencia de la incorporación de astaxantina en la dieta de postlarvas sobre la toxicidad del nitrito.
3. Evaluar los efectos del nitrito en de individuos alimentados con dietas suplementadas con extractos solubles de polisacáridos del alga parda *Undaria pinnatifida*.

4. Estudiar biomarcadores de estrés en las condiciones de cultivo propuestas en los objetivos anteriores, evaluando:

- La concentración de metabolitos en hemolinfa.
- La actividad antioxidante total de los homogenatos liofilizados de hepatopáncreas, por medición de la degradación del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH).
- La actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD).
- El daño tisular mediante el examen histológico de branquias y hepatopáncreas.

## Capítulo 2

# Influencia de la salinidad sobre la toxicidad del nitrito

Los resultados obtenidos fueron parcialmente publicados en:

- Espino, M.L.; Velurtas, S.M.; Díaz, A.C., Fenucci, J.L. 2013. Effects of nitrite on antioxidants defenses of shrimp *Pleoticus muelleri* (CRUSTACEA, SOLENOCE-  
RIDAE). Biocell, 37(2): A86. ISSN 0327 – 9545.
- Espino, M.L.; Díaz, A.C., Fenucci, J.L. 2014. Histopathology alterations of the shrimp *Pleoticus muelleri* by effect of the environmental nitrite. Biocell, 38(2):  
A1-A124 ISSN 0327-9545.

### 2.1. Introducción

Los crustáceos decápodos son organismos móviles que presentan como característica general un cierto grado de tolerancia a la variación de salinidad. Muchos de ellos realizan migraciones diarias, estacionales o anuales relacionadas a la alimentación o la reproducción, las cuales los exponen a grandes cambios de salinidad (Mantel, 1983). Según Clark (1992), la capacidad adaptativa de los camarones peneidos es especie específica y está determinada por un número de factores que dieron por resultado que las especies se distribuyan diferencialmente en el gradiente marino-estuarial.

En el ciclo de vida de un peneido típico, como son *Litopenaeus vannamei*, *Penaeus monodon*; *Farfantepenaeus subtilis* y *Litopenaeus stylirostris*, la maduración y reproducción se realiza en aguas profundas, entre 15 y 60 metros; las hembras fecundadas ponen huevos en cantidades variables de acuerdo a la especie. Al cabo de un tiempo, se produce la eclosión de los huevos dando lugar a una serie de estadios larvales, cada uno de los cuales tiene características morfológicas determinadas y diferentes requerimientos nutricionales. En estas especies, los siguientes estadios, postlarval y/o juvenil, migran hacia la costa a aguas menos profundas y de baja salinidad, por ejemplo zonas de manglar, esteros, lagunas, ricas en materia orgánica, donde crecen hasta alcanzar el estadio adulto y luego migran a mar abierto para madurar y reproducirse. Sin embargo, existen otras especies como *Pleoticus muelleri* que tienen un ciclo de vida algo diferente; este langostino habita las aguas templadas de las costas argentinas y casi nunca penetra en aguas salobres. De acuerdo con Boschi (1986), el área de reproducción de esta especie se encuentra en aguas profundas frente a la costa de la provincia de Chubut, entre Península Valdés y el norte del Golfo San Jorge. Desde esta zona las larvas son llevadas por las corrientes hacia el sur, siendo la principal área de cría el sur del Golfo (Bajo Mazarredo); los juveniles permanecen en esta zona y cuando alcanzan una talla aproximada de aproximadamente 10 cm migran hacia el norte para su maduración y reproducción. En cuanto a la población de *P. muelleri* que se encuentra en la zona sur de la provincia de Buenos Aires, se sabe que la reproducción se realiza mar adentro y los juveniles llegan hasta áreas costeras (Wyngaard y Bertuche, 1982). Su estrecho rango de distribución en el gradiente salino, caracteriza a esta especie como más susceptible a las variaciones de salinidad.

Las respuestas fisiológicas son esenciales para evaluar el rendimiento animal en diferentes condiciones ambientales (Hernández *et al.*, 2006; Allan *et al.*, 2006; Menezes *et al.*, 2006). En general, los cambios en factores físicos como la temperatura y la salinidad influyen en el metabolismo, crecimiento, muda y supervivencia de los camarones (Silva, Calazans *et al.*, 2010; W. *et al.*, 2016); además, la salinidad altera los valores de recuento de hemocitos totales y parámetros inmunológicos (Perazzolo *et*

*al.*, 2002; Liao *et al.*, 2012; Li, Wang *et al.*, 2017). La manipulación experimental independiente de estos parámetros permite aislar los efectos que ellos pueden ocasionar sobre las respuestas fisiológicas de los organismos (Lester y Pante, 1992), estos factores son relevantes desde el huevo hasta el adulto ya que modifican la tasa metabólica y la excreción de desechos nitrogenados (Lemos *et al.*, 2001).

El amonio es el principal producto nitrogenado de desecho de los crustáceos (Dall *et al.*, 1990) y su excreción es afectada por factores intrínsecos, como el tamaño corporal y el estadio del ciclo de muda, y extrínsecos como la temperatura, la salinidad y el oxígeno disuelto (Needham, 1957). La acumulación a niveles tóxicos (Hargreaves, 1998) de amonio excretado y de nitrito producido por bacterias nitrificantes (Jensen, 2003), está asociada con la alta densidad de animales en los sistemas de cultivo intensivo. Su toxicidad es influenciada por la salinidad ambiental y está relacionada con efectos respiratorios, por la formación de metahemocianina, y a la generación de radicales libres y especies reactivas del oxígeno que causan un desequilibrio en el sistema de defensas antioxidantes, el cual puede ser estimado a través de la medición de la actividad antioxidante total (AT).

En crustáceos y peces dulceacuícolas, la absorción de nitrito se realiza en las branquias mediante mecanismos activos de entrada del ión cloruro ( $Cl^-$ ); se provoca de esta manera una inhibición competitiva, favoreciendo la captación activa del poluyente. Por el contrario, en los organismos marinos, la toma de iones es llevada a cabo por el epitelio intestinal, mientras que a través de las branquias sólo se realiza una pérdida pasiva de  $Cl^-$  y la toma branquial de nitrito seguiría una dirección opuesta al transporte de  $Cl^-$  en este órgano (Jensen, 2003).

El estrés provocado por la exposición a los compuestos nitrogenados inorgánicos como así también cambios en la salinidad, pueden afectar la concentración de metabolitos tales como glucosa, lípidos y proteínas en distintos organismos (Hong, Chen, Qin *et al.*, 2009; Campos Miranda-Filho *et al.*, 2009; Intanai *et al.*, 2009; Joseph y Philip, 2007). En consecuencia, la determinación de sus niveles puede ser utilizada para estimar el estado fisiológico de los animales expuestos a diferentes situaciones de estrés (Lorenzon *et al.*, 2008).

En la fisiología de los organismos acuáticos, la salinidad desempeña un papel importante porque determina su distribución y supervivencia (Ponce Palafox *et al.*, 1997; Díaz, Farfan *et al.*, 2001). La manera en que estos organismos responden a sus variaciones es adaptándose al ambiente, al desarrollar mecanismos de osmorregulación que les permitan regular su medio interno; este proceso se realiza en la hemolinfa y el intercambio se obtienen a través del tejido branquial y el tracto digestivo, principalmente (Stern *et al.*, 1984; Eckert *et al.*, 1990; Péqueux, 1995). Estos tejidos también son el sitio de ingreso de tóxicos, como el nitrito, que se encuentran en el agua de cultivo (Jensen, 2003). Por lo tanto, el análisis histológico de estos tejidos es una herramienta útil para el registro del estado fisiológico de un individuo, como también para evaluar la calidad del agua (Vogt, 1987; Winkaler *et al.*, 2001).

El objetivo principal de este capítulo fue determinar la influencia de la salinidad en la toxicidad del nitrito sobre el langostino *Pleoticus muelleri*. Para ello se plantearon los siguientes objetivos particulares:

- Determinar la concentración letal media ( $LC_{50}$ ) al nitrito.
- Evaluar los daños histológicos en branquias y hepatopáncreas de los animales expuestos a diferentes concentraciones de nitrito.
- Establecer los efectos del nitrito sobre la actividad antioxidante total (AT) y analizar la presencia de radicales propios.
- Determinar el efecto sobre las variables metabólicas y la AT, de langostinos aclimatados a diferentes salinidades y expuestos a nitrito.

## 2.2. Toxicidad aguda al nitrito

### 2.2.1. Materiales y métodos

#### 2.2.1.1. Determinación de la $LC_{50}$

Para los experimentos se emplearon ejemplares adultos de ambos sexos de la especie *P. muelleri* ( $8,64 \pm 0,5g$ ) capturados con una lancha de pesca comercial en la



zona costera de Mar del Plata, Argentina (38°S, 57° 33' O). Los animales fueron aclimatados por 48hs en tanques internos de 3000 litros, en las siguientes condiciones: fotoperiodo: 12h luz/12h de oscuridad; temperatura  $18 \pm 0.8$  °C y pH 7. Las mismas se mantuvieron durante toda la experimentación. Transcurrido el período de aclimatación, se procedió a realizar los experimentos.

Con el fin de obtener la  $LC_{50}$  al nitrito, se realizó un ensayo de toxicidad aguda con langostinos mantenidos a 33 de salinidad. Se llevaron a cabo por triplicado ensayos estáticos de toxicidad aguda a concentraciones crecientes de nitrito (100; 200; 300; 400; 500; 750; 1000; 1250 y 1500 mg/l), utilizando como controles individuos mantenidos en agua libre de nitritos.

#### 2.2.1.2. Análisis histológico

Para evaluar el daño tisular producido por la exposición al nitrito se realizó el examen histológico de branquias y hepatopáncreas del langostino *Pleoticus muelleri*. Se utilizaron animales provenientes del ensayo estático de toxicidad aguda. El cefalotórax de cada individuo se fijó en el fluido Davison durante 12 hs (etanol, formol, ácido acético y agua) (Bell y Lightner, 1988), posteriormente se deshidrataron en concentraciones crecientes de etanol, alcohol butílico y se incluyeron en butil-parafina y parafina. Se efectuaron cortes de 5µm, que fueron coloreados con hematoxilina-eosina (H&E).

Para la evaluación de los cambios histológicos en el hepatopáncreas, se utilizaron las caracterizaciones realizadas Cuartas *et al.* (2002). En el caso de las branquias, previamente se realizó una breve descripción de su morfología e histología en estado salvaje.

#### 2.2.1.3. Actividad antioxidante total

Al finalizar el primer ensayo de toxicidad aguda, en el cual se mantuvo a los animales a 33 de salinidad, se seleccionaron langostinos expuestos a 0; 100; 200; 400 y 500 mg/l de nitrito. A estos individuos se le extrajeron los hepatopáncreas, que se liofilizaron y conservaron a -20°C hasta su procesamiento. El homogenato de los

hepatopáncreas se utilizó para determinar la capacidad antioxidante total (AT) y estudiar la presencia de los radicales propios del tejido. El análisis de la presencia de radicales en las muestras se estimó mediante la espectroscopia de resonancia paramagnética electrónica (EPR). Se utilizó un espectrofotómetro Bruker ELEXSYS E 500T operando en X-Band; en la tabla 2.1 se puede observar la configuración del equipo para obtener de los espectros.

TABLA 2.1: X-band Espectro de Resonancia Magnética de DPPH

Configuración del equipo	
Campo magnético centrado(mT)	346.5
potencia de microondas (mW)	12.93
frecuencia de microondas(GHz)	9.71
atenuación (dB)	12
modulador de frecuencia(KHz)	100
modulación de amplitud(mT)	100
temperatura(K)	293
ancho de barrido(mT)	10
ganancia	60
tiempo de barrido(s)	60

Las mediciones fueron repetidas tres veces para minimizar el error. Se utilizó el programa de ploteo estándar Origin Pro para realizar el ajuste de los puntos.

Como método de análisis para la determinación de AT se empleó la capacidad de los radicales presentes en el tejido para reaccionar con el radical estable, el 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH). Para tal fin, 25 mg de tejido liofilizado de cada muestra fueron mezclados con 1ml de cloroformo bajo atmósfera de argón. Cada mezcla de reacción contenía 50µl de muestra y 50µl de DPPH ( $2,8 \times 10^{-5}$  M). Se preparó un control o blanco reemplazando el volumen de solución del tejido por cloroformo y se observó que el espectro en EPR de dicha solución permanece inalterada durante el tiempo empleado en las mediciones. Las muestras se colocaron en tubos de cuarzo de 4 mm de diámetro interno para conseguir una afinación adecuada en el equipo,

se trabajó en atmósfera de argón y a una temperatura constante de 293K. El análisis en el equipo se realizó a intervalos de 60 minutos.

Para la evaluación de los radicales propios, se realizaron mediciones utilizando alícuotas de 100µl de homogenatos preparados con 20mg de tejido liofilizado y 200µl de cloroformo. Se realizan mediciones por triplicado y a distintos tiempos.

#### 2.2.1.4. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos en cada experimento de toxicidad se analizaron mediante un análisis Probit (Finney, 1971), calculado con el programa informático XLSTAT. La prueba de  $\chi^2$  fue utilizada para probar la bondad de ajuste de la línea de Probit estimada. Para el análisis de Los resultados de la actividad antioxidante se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) para evaluar las diferencias entre los tratamientos. En todos los casos, la significación se estableció como  $p < 0,05$  (Sokal y Rohlf, 1995).

#### 2.2.2. Resultados

Los resultados del ensayo de toxicidad aguda al nitrito para *P. muelleri* mantenidos a 33 de salinidad se muestran en la tabla 2.2. La  $LC_{50}$  determinada para el nitrito a las 96 horas del ensayo estático fue 170,56 mg/l, observándose una disminución de este valor ante el incremento del tiempo de exposición.

TABLA 2.2: Valores de concentración letal media ( $LC_{50}$ ) al nitrito para *P. muelleri* mantenido a 33 de salinidad

Tiempo (hs)	$LC_{50}$	Limite de confianza		$\chi^2$
		Inferior	Superior	
24	1090,05	893,63	1422,25	42,46
48	684,26	531,02	866,04	30,50
72	494,37	237,69	699,61	33,04
96	170,56	-445,68	399,57	20,50

En la figura 2.1 se muestran la histología del hepatopáncreas de *P. muelleri*. La evaluación histológica del hepatopáncreas de los langostinos control y los expuestos a 100mg/l de nitrito no presentaron alteraciones tisulares. Sin embargo, la exposición a 200mg/l de nitrito provocó un incremento en el número de células B, que presentaron su característica vesícula de gran tamaño llena de secreción, además de presentar un complejo vacuolar apical; también se observaron zonas con hiperplasia. El incremento de nitrito ambiental, 300 y 400 mg/l, acentuó la hiperplasia y provocó la distorsión de la estructura tubular; en cuanto a la citología, las células comenzaron a perder su identidad, observándose algunas células en forma de botella. A concentraciones superiores de nitrito, aparecen espacios intertubulares, las células presentan una mayor vacuolización, además de observarse protrusión citoplasmática hacia la luz tubular; sólo las células F pueden ser claramente identificables debido a que mantienen su citología característica. A 1000 mg/l de nitrito no pueden ser identificados ninguno de los distintos tipos celulares debido a la pérdida de la identidad celular.

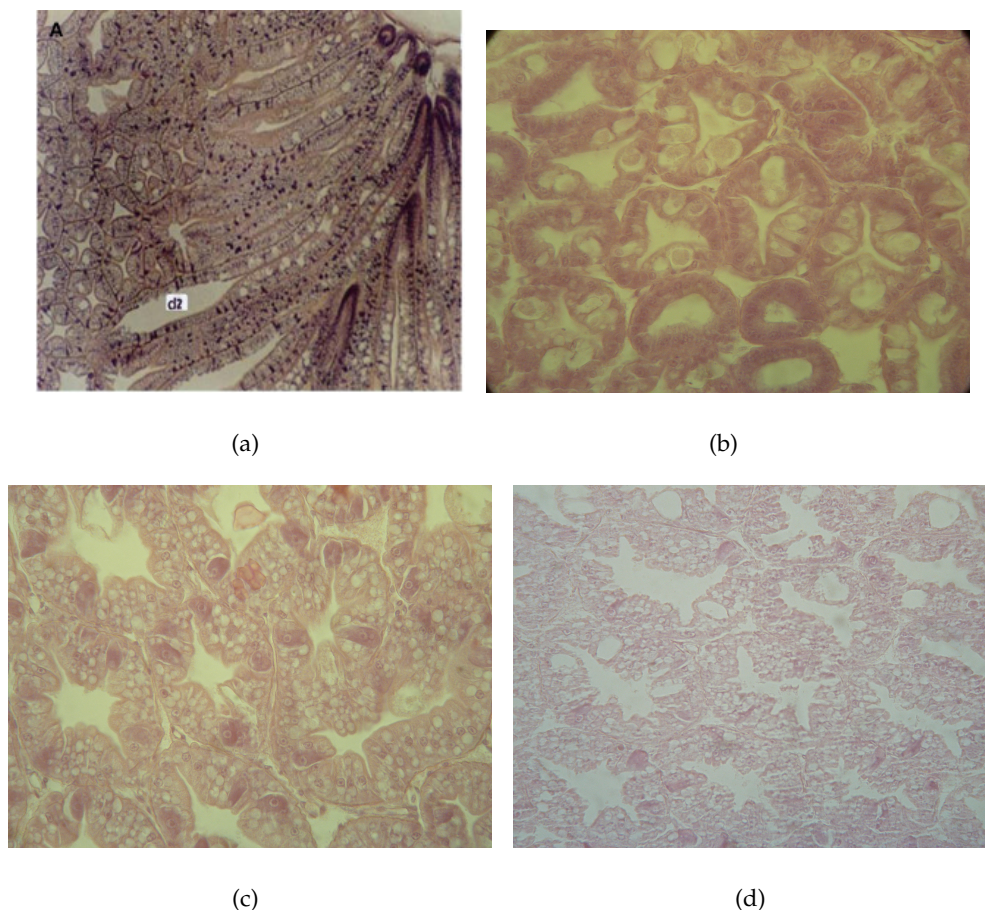


FIGURA 2.1: Cortes transversales de hepatopáncreas de *P. muelleri* expuestos a nitrito.

**2.1(a)** Tratamiento control, sin alteraciones (X 25) **2.1(b)** La exposición a 300 mg/l de nitrito provocó el incremento de células B, distorsión tubular y aparición de zonas de hiperplasia (X 100). **2.1(c)** El tratamiento con 750 mg/l de nitrito muestra una abundante vacuolización de todas la células, pudiéndose sólo identificar las células F (X 100). **2.1(d)** A 1000 mg/l de nitrito se perdió completamente la identidad celular (X 100).

En el caso de las branquias, debido a que no se contaba con una caracterización de su morfología general, se efectuó una breve descripción antes de realizar un análisis de los efectos del nitrito sobre estos órganos.

El langostino *Pleoticus muelleri* realiza el intercambio gaseoso a través de estructuras especializadas denominadas dendrobranquias, ellas se disponen a los lados del cefalotórax en la base de los apéndices torácicos (maxilípedos y periópodos). Estas branquias, consisten de un eje central de tejido conectivo donde se disponen las laminillas branquiales, las mismas se ramifican en filamentos primarios y secundarios.

Cada laminilla consta de un septo de tejido conectivo que separa el canal aferente del eferente, y de un epitelio simple con al menos dos tipos celulares. Uno de ellos posee un núcleo comprimido y una considerable expansión lateral, dando un aspecto de epitelio escamoso en la zona del canal marginal. El otro tipo celular, conecta las dos

superficies cuticulares de la laminilla y limita los espacios lagunares que definen el flujo hemolinfático, cumpliendo una función de sostén. Según Taylor y Taylor (1992), las características mencionadas anteriormente concuerdan con las llamadas “Thin cells”, en el caso del primer tipo celular y “Pillar cells” en el segundo caso.

En la figura 2.2 se muestra la histología de las branquias de *P. muelleri*. El tratamiento con nitrito provocó desorganización epitelial y plegamiento de la cutícula, ambos efectos se acentúan con el incremento de este poluyente. En la exposición a 400 mg/l de nitrito se observan los canales marginales distorsionados. Además de estas histopatologías, se observa edematización de la laminilla con el tratamiento de 500mg/l de nitrito. Concentraciones superiores de nitrito ambiental produjeron, además de la presencia de lagunas subcuticulares, el colapso de la laminilla. A 1000 mg/l de nitrito se detectó interrupción de la cutícula con el consiguiente deterioro de la laminilla branquial, este efecto se evidencia por la pérdida de la estructura epitelial.



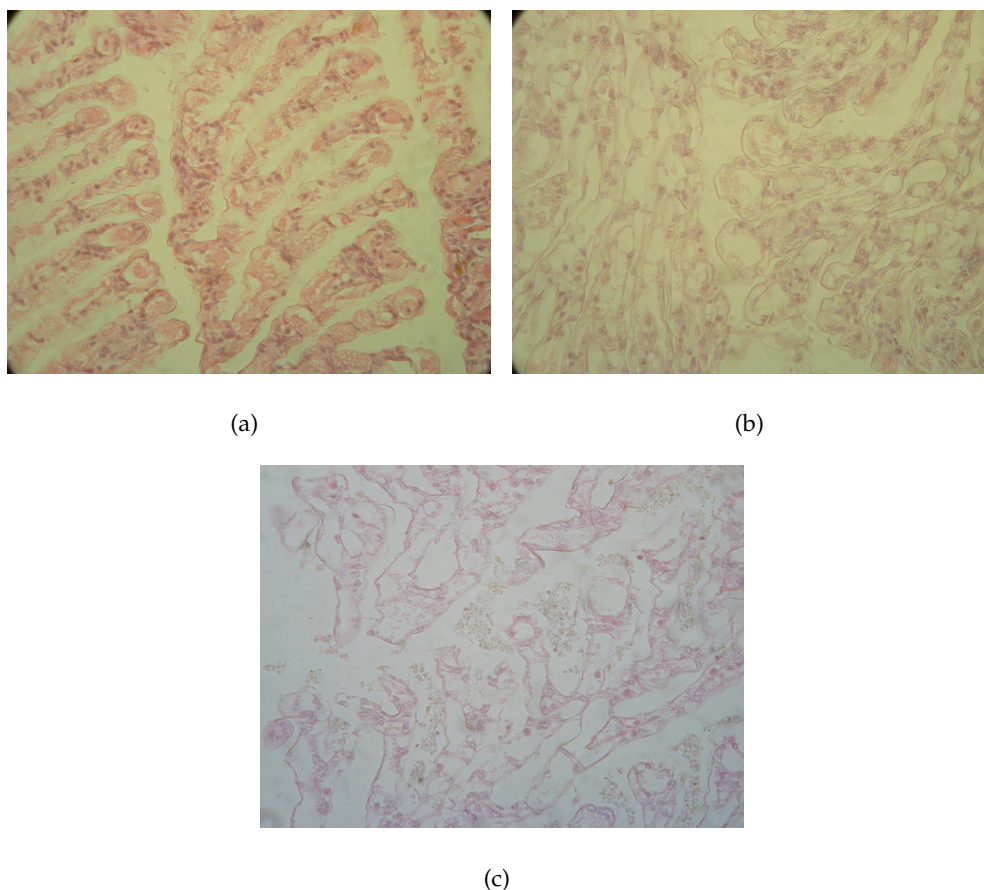


FIGURA 2.2: Cortes transversales de branquias de *P. muelleri* expuestos a diferentes concentraciones de nitrito.

**2.2(a)** Laminilla branquial correspondiente al tratamiento control, no se visualizan alteraciones. **2.2(b)** En el tratamiento con 300 mg/l de nitrito, se observa desorganización epitelial y plegamiento de la cutícula. **2.2(c)** Al exponer a los langostinos a 1000 mg/l de nitrito, se detecta interrupción de la cutícula con el consiguiente deterioro de la laminilla (X 40).

La capacidad AT se midió en individuos expuestos a 100; 200; 400 y 500 mg/l de nitrito; sus resultados se muestran en la figura 2.3. Todos los tratamientos testeados mostraron capacidad de secuestrante de radicales, que se evidenció por su habilidad para reaccionar con el radical DPPH. El porcentaje de decaimiento en función del tiempo fue mayor en los langostinos expuestos a concentraciones de nitritos cercanas a la  $LC_{50}$  (100 y 200 mg/l); el análisis de ANCOVA realizado sobre los 6 primeros minutos de reacción (fase lineal) indicó que esas diferencias son significativas respecto del control. Para el mismo tiempo de reacción, la actividad antioxidante de los langostinos expuestos a 400 mg/l de nitrito fue significativamente menor, pero no se determinó diferencias en aquellos expuestos a 500 mg/l. Sin embargo, a los 15 minutos de reacción todos los tratamientos con nitrito registraron un porcentaje de DPPH remanente menor al control (0,1 % y 0,22 %, respectivamente).

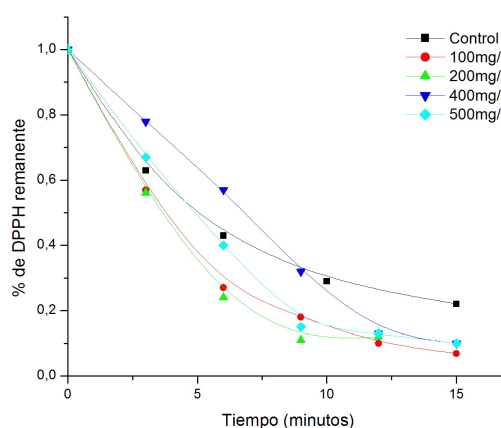


FIGURA 2.3: Porcentaje del radical DPPH remanente en función del tiempo en *P. muel-leri* expuestos a nitritos y mantenidos a 33 de salinidad. Para cada tratamiento se llevaron a cabo mediciones por triplicado.

En los homogenatos concentrados de muestras de animales expuestos a 0; 100; 200; 400 y 500 mg/l de nitrito fueron medidos y cuantificados los radicales propios de los tejidos. En todas las muestras se registró una amplia señal que sugirió la presencia de radicales persistentes en el tejido. Se estimó una concentración de entre  $10^{-4}$  y  $10^{-5}M$  en cada uno de los tratamientos; sin embargo el análisis estadístico no mostró diferencias significativas entre las concentraciones de nitrito utilizadas.

## 2.3. Influencia de la salinidad sobre la toxicidad del nitrito

### 2.3.1. Materiales y métodos

#### 2.3.1.1. Ensayo de toxicidad aguda

Langostinos adultos ( $8,00 \pm 0,5g$ ) de ambos sexos, obtenidos mediante pesca en lancha comercial en las aguas costeras de Mar del Plata, Argentina ( $38^{\circ} S$ ,  $57^{\circ} 33' O$ ), fueron aclimatados en acuarios de vidrio de 150 litros con un filtro bajo grava y un lecho de arena y conchillas trituradas, a una densidad de 10 individuos por  $m^2$  durante 3 semanas a 25 y 30 de salinidad; como controles se utilizaron animales mantenidos a 33 de salinidad. Con el fin de obtener la  $LC_{50}$  al nitrito, se realizó un



ensayo estático de toxicidad aguda. Para ello los individuos fueron colocados en recipientes de PVC de 16 litros y expuestos a 0; 50; 100 y 200 mg/l de nitrito por 96 hs (estas concentraciones de nitrito fueron elegidas en base a los resultados obtenidos en el experimento 2.2.1.1). Las condiciones experimentales fueron: fotoperíodo, 12 h luz/12 h oscuridad; temperatura,  $20 \pm 0,8^{\circ}\text{C}$  y pH 7.

#### **2.3.1.2. Actividad antioxidante total (AT)**

La metodología empleada se detalla en el ítem 2.2.1.3.

#### **2.3.1.3. Análisis de variables metabólicas**

Para la determinación de las variables metabólicas se extrajeron entre 200 y 300  $\mu\text{l}$  de hemolinfa que se colocaron en una solución anticoagulante de citrato de sodio al 10 %. Se realizaron 3 réplicas de cada tratamiento. Las muestras se centrifugaron a 10.000g durante 15 minutos a  $-4^{\circ}\text{C}$ , los sobrenadantes se utilizaron para las determinaciones bioquímicas, a partir de kits comerciales de BioSystems.

##### **Glucosa**

La determinación de glucosa se realizó mediante el método enzimático, el cual utiliza la glucosa oxidasa (GOD) para reaccionar con la glucosa presente en la muestra, las moléculas de peróxido de hidrógeno formadas, junto a otras moléculas son el sustrato de la peroxidasa (POD) para formar la quinonimina roja (Trinder, 1969). La absorbancia leída a 505 nm es proporcional a la concentración de glucosa en la muestra.

##### **Proteínas totales**

La determinación de proteínas totales se realizó siguiendo el método colorimétrico, el cual se basa en la propiedad de las uniones peptídicas de las proteínas de reaccionar con el ión cúprico, en medio alcalino, para dar un complejo color violeta con máximo de absorción a 540 nm. La intensidad es proporcional a la concentración de proteínas totales en la muestra.

### Colesterol

La determinación del colesterol libre se realizó mediante el siguiente método enzimático. Tanto el colesterol libre como el esterificado presente en la muestra originan, según las reacciones acopladas descritas a continuación, un complejo coloreado que se cuantifica por espectrofotometría (Meiattini *et al.*, 1978).

### Triglicéridos

La determinación de triglicéridos se realizó siguiendo el método enzimático (Buccollo y David, 1973), cuyo fundamento está basado en una serie de reacciones acopladas que tienen como sustrato a los triglicéridos presentes en la muestra. Como producto final se obtiene un complejo coloreado que se cuantifica por espectrofotometría, leyendo la absorbancia a 500 nm.

#### 2.3.1.4. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos en cada experimento de toxicidad se analizaron mediante un análisis Probit (Finney, 1971), calculado con el programa informático XLSTAT. La prueba de  $\chi^2$  fue utilizada para probar la bondad de ajuste de la línea de Probit estimada. Para el análisis de Los resultados de la actividad antioxidante se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) para evaluar las diferencias entre los tratamientos. El coeficiente de correlación de Pearson se utilizó para relacionar la variación en la concentración de los metabolitos con el incremento en los niveles ambientales de nitritos, calculado con el programa estadístico BioSTAT. En todos los casos, la significación se estableció como  $p < 0,05$  (Sokal y Rohlf, 1995).

#### 2.3.2. Resultados

El ensayo estático de toxicidad aguda determinó que la  $LC_{50}$  al nitrito para los langostinos aclimatados a 25 de salinidad fue de 6,41 mg/l ( $\chi^2$ : 2,98) y de 50,93 mg/l ( $\chi^2$ : 1,42) para aquellos mantenidos a 30 de salinidad.

La medición de la AT determinó que el tejido hepatopancreático de *P. muelleri* es un antioxidante natural, debido a la de reacción del tejido con el radical 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH). La capacidad antioxidante, de los langostinos mantenidos a 33 de salinidad, no fue afectada por la exposición a concentraciones bajas de nitrito (50 y 100mg/l), pero se detectó una diferencia significativa en el aumento de actividad antioxidantes en aquellos expuestos a 200mg/l de nitrito. Por el contrario, la presencia de nitrito en el ambiente provocó variaciones de las defensas antioxidantes de los animales aclimatados a 30 y a 25 de salinidad. En el primer caso, la exposición a 50 y a 200mg/l de nitrito provocó un incremento de la AT respecto del control; sin embargo, a 100mg/l se detectó una disminución de la capacidad antioxidante. En el segundo caso, a 25 de salinidad la presencia de nitrito causó el aumento significativo de la AT, detectandose a los 6 minutos de reacción un 6 % de DPPH remanente, en los tratamientos con 50 y 100mg/l de nitrito, 0,23 % en el expuesto a 200mg/l, y un 47 % en el control (Figura 2.4).

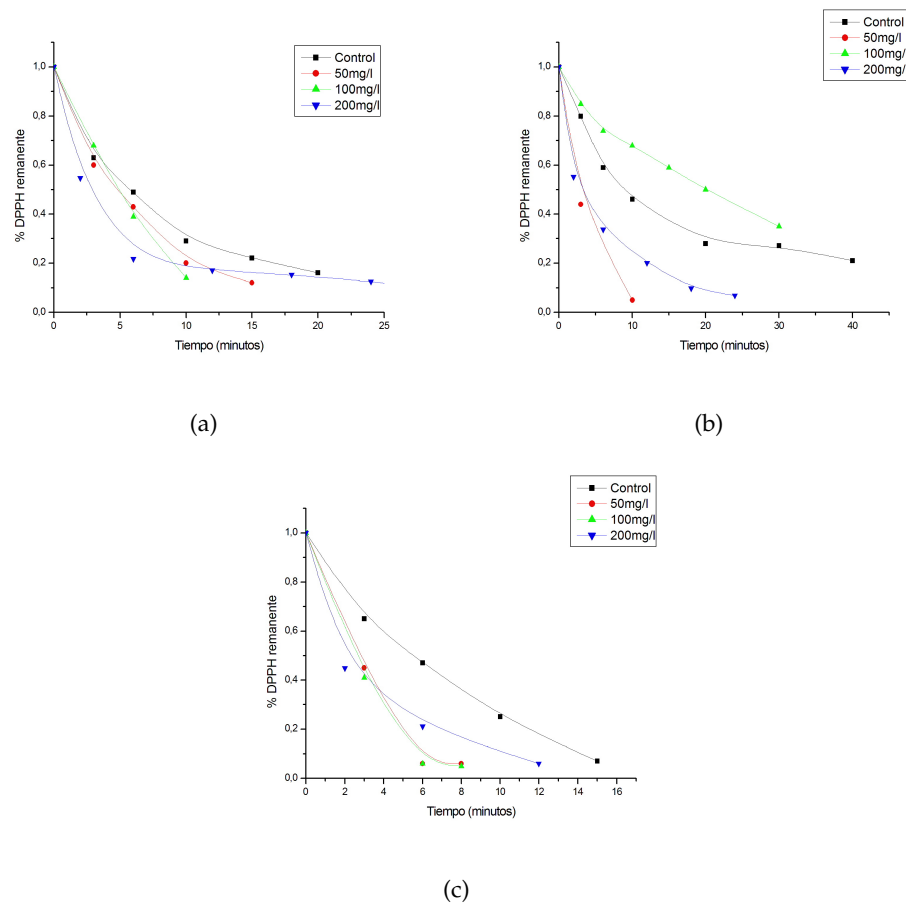


FIGURA 2.4: Actividad antioxidante total (AT) en el tejido hepatopancreático de ejemplares de *P. muelleri* expuestos a nitrito.  
 2.2(a) Mantenidos a 33 de salinidad; 2.2(b) aclimatados a 30 de salinidad; 2.2(c) aclimatados a 25 de salinidad.

El análisis de Pearson determinó que existe correlación entre la concentración de alguno de los metabolitos estudiados y el incremento de los niveles ambientales de nitrito, de los ejemplares mantenidos en las diferentes salinidades. En los langostinos mantenidos a 33 de salinidad, los triglicéridos mostraron correlación negativa con el nitrito; en el caso de los aclimatados a 30 la correlación fue positiva para los niveles de glucosas y proteínas; y en los animales aclimatados a 25 de salinidad fue negativa para la glucosa (Tabla 2.3).

TABLA 2.3: Matriz de correlación de las variables metabólicas y la concentración de nitrito ambiental para *P. muelleri*.

2.3(a) 33 de salinidad; 2.3(b) aclimatados a 30 de salinidad; 2.3(c) aclimatados a 25 de salinidad. CN-concentración de nitritos; P-proteínas; G-glucosa; C-colesterol; T-triglicéridos. \* $P < 0,05$ .

(a)					
	CN	P	G	C	T
CN	1				
P	0,243	1			
G	0	0,004	1		
C	0,157	0,913	0	1	
T	-0,802*	0,287	-0,323	0,294	1

(b)					
	CN	P	G	C	T
CN	1				
P	0,867*	1			
G	0,905*	0,967	1		
C	0,174	0,573	0,577	1	
T	0,674	0,951	0,894*	0,775	1

(c)					
	CN	P	G	C	T
CN	1				
P	-0,166	1			
G	-0,870*	-0,166	1		
C	0,426	0,499	-0,816*	1	
T	0,09	0,876*	-0,522	0,853*	1

## 2.4. Discusión

La salinidad puede influenciar a los camarones en varias formas, incluyendo efectos ecológicos y fisiológicos (Bray *et al.*, 1994; Silva, Calazans *et al.*, 2010; Li, Wang *et al.*,

2017). Los primeros parámetros que pueden verse modificados son el crecimiento y la supervivencia, por ejemplo *Litopenaeus vannamei*, si bien es una especie eurihalina (Pante, 1990), requiere una salinidad superior a 20 para obtener óptimos resultados a ganancia en peso y supervivencia (Ponce Palafox *et al.*, 1997). En el caso de *P. muelleri*, no se observan patrones de tolerancia a la salinidad como en otras especies de camarones penaeoides de interés comercial; se presenta como una especie estenohalina que a 25 de salinidad es el límite que permite una buena supervivencia en cautiverio (Harán, Fenucci *et al.*, 1992). La variación de la salinidad además modifica la interacción entre los organismos acuáticos y los compuestos tóxicos, como el nitrito, que se acumulan en el agua de cultivo, los cuales también afecta la supervivencia de los animales. Lin y Chen (2003) reportaron que la toxicidad del nitrito en juveniles de *L. vannamei* incrementa cuando estos camarones marinos son expuestos a salinidades inferiores, obteniéndose una  $LC_{50}$  321,7; 178,3 y 76,5 mg/l de nitrito a 35; 25 y 15 de salinidad, respectivamente. Los resultados del presente estudio muestran una respuesta similar, la toxicidad del nitrito aumentó para los langostinos expuestos a condiciones hiposmóticas, los valores de  $LC_{50}$  obtenidos para *P. muelleri* aclimatados a 33; 30 y 25 de salinidad fueron 170,53; 50,93 y 6,41 mg/l de nitrito, respectivamente. Hay evidencia de que el nitrito tiene una afinidad por el mecanismo de captación de  $Cl^-$  branquial, también se lo conoce como un inhibidor competitivo de la captación de cloruro; por lo tanto, la baja concentración de  $Cl^-$  en el agua aumenta la afluencia de nitrito y más con el aumento de la concentración ambiental de nitrito. Como consecuencia, la toxicidad del mismo es mayor en los animales de agua dulce que en los marinos (Jensen, 2003).

La respuesta tisular y celular a un estresante puede observarse en un estadio prematuro de daño, antes que se evidencie a nivel del animal entero y mucho más temprano que se manifieste a nivel poblacional (Moore, 1985); por lo tanto, el análisis histológico es una herramienta adicional para evaluar las condiciones ambientales. Debido a la importancia del hepatopáncreas en la economía general de los camarones, las anormalidades fisiológicas causadas por estrés, a menudo se visualizan en este órgano (Jhonson, 1980). Cuartas *et al.* (2003) determinaron que la disminución de la salinidad provoca modificaciones citológicas e histológicas en el hepatopáncreas

de *P. muelleri*, observándose como principales efectos el deterioro del epitelio tubular y la vacuolización del citoplasma de las células R y F. En el presente estudio, la exposición de *P. muelleri* a concentraciones crecientes de nitrito ambiental provocaron algunas de los cambios descritos previamente por dichos autores; las células presentan un incremento en su vacuolización dando la apariencia de células foamy (Harán, Díaz *et al.*, 2013). Otro efecto observado fue el incremento de las células B, las cuales están relacionadas con la síntesis de enzimas digestivas (Al-Mohanna y Nott, 1989; Caceci *et al.*, 1988). Li, Chen *et al.* (2008) observaron la misma respuesta en *L. vannamei* expuestos a bajas salinidades y relacionó la alta tasa de síntesis y liberación de enzimas digestivas y antioxidantes con una aceleración de la movilización de nutrientes en los túbulos hepatopáncreas, para suministrar más energía destinada a la osmorregulación del camarón a alta o baja salinidad, y lograr su adaptación al estrés ambiental.

En los organismos acuáticos, las branquias son el punto de ingreso de los tóxicos que se encuentran en el agua, dado que estos órganos están en contacto constante con el medio acuoso (Jensen, 2003); por lo tanto, su análisis histológico puede revelar respuestas adaptativas o cambios inducidos por los tóxicos (Mallatt, 1985). Las observaciones realizadas en el presente estudio, determinaron que la presencia de nitrito ambiental causa alteraciones en el tejido branquial tales como hiperplasia y plegamiento de la cutícula, las cuales se acentúan con el incremento de la concentración del poluyente, perdiendo casi por completo la estructura epitelial al exponer a los langostinos a 1000 mg/l de nitrito. Resultados similares fueron reportados por Romano y Zeng (2009) para el cangrejo *Portunus pelagicus* expuestos a concentraciones subletales de nitrito.

Para equilibrar la respuesta oxidante, los organismos vivos disponen de una serie de sistemas antioxidantes que contrarrestan la generación de radicales libres (RL) (Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2004). En condiciones fisiológicas normales, estos mecanismos de defensa mantienen baja la concentración de especies reactivas del oxígeno (ROS) y RL en la célula; por lo tanto, la existencia de un pool de radicales *in vivo* dependerá del balance entre diversos procesos: aquellos que conducen a la formación

de sustancias protectoras, los que liberan radicales reactivos y los que generan radicales persistentes. Las sustancias protectoras neutralizan los radicales muy reactivos, transformándolos en especies metabolizables o formando radicales persistentes (Díaz, Velurtas *et al.*, 2013). En base a los resultados obtenidos en este estudio, se puede decir que el sistema de defensas antioxidantes de *P. muelleri* es capaz de mantener la concentración del pool de radicales propios en condiciones de estrés, provocado por la exposición al nitrito.

El desequilibrio entre la actividad prooxidante y las defensas antioxidantes es uno de los mecanismos de toxicidad del nitrito (Wang, Wang, Zhang *et al.*, 2004). La manera de evaluar las defensas antioxidantes extracelulares es a través de la medición de la denominada capacidad antioxidante total (AT), en la cual se considera la acción acumulativa de todos los antioxidantes presentes en los fluidos corporales, siendo un parámetro integrado, más que una simple suma de antioxidantes medidos (Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2004; Díaz, Velurtas *et al.*, 2013; Luo *et al.*, 2009, Paital y Chainy, 2010). En el presente estudio, todos los tratamientos mostraron actividad protectora antioxidante evidenciada por la capacidad de reaccionar con el radical 2,2-difetil-1-picrilhidracilo (DPPH). A partir de la medición de la degradación de este radical, se determinó que el sistema de defensas antioxidantes de *P. muelleri* es capaz de regular su actividad ante el incremento de nitrito ambiental; y que en condiciones hiposmóticas el langostino es más susceptible a la exposición al nitrito, sin embargo es capaz de estabilizar el ataque de los ROS y RL incrementando la AT. Una respuesta similar de ajuste de la actividad antioxidante en *L. vannamei* fue reportada por Li, Chen *et al.* (2008) ante la variación de la salinidad, asimismo Liao *et al.* (2012) reportaron una mayor actividad de catalasa y un incremento de la peroxidación lipídica, pero una actividad constante de la enzima superóxido dismutasa, en el hepatopáncreas de este camarón aclimatado a baja salinidad y expuesto a nitrito.

La concentración hemolinfática de variables metabólicas es utilizada como indicador para estimar el estado fisiológico de los animales, debido a que sus concentraciones varían según la dieta (Velurtas *et al.*, 2011) y las diferentes situaciones de estrés (Lorenzon *et al.*, 2008). En los crustáceos, las concentraciones de proteínas, glucosa, colesterol, etc. varían ante cambios en la salinidad ambiental (Joseph y Philip, 2007)



o la presencia de compuestos nitrogenados en el agua (Yildiz y Karasu Benli, 2004; Hong, Chen, Sun *et al.*, 2007; Hong, Chen, Qin *et al.*, 2009). En este estudio, el análisis de las variables metabólicas de *P. muelleri* determinó que los niveles de glucosa se correlacionan con el aumento de la concentración ambiental de nitrito en condiciones hiposmóticas; asimismo, Hong, Chen, Qin *et al.* (2009) reportaron que la glucosa hemolinfática aumenta su concentración en respuesta al estrés por nitrito en el cangrejo *Eirocheir sinensis*.



## Capítulo 3

# Efectos de la astaxantina dietaria sobre la tolerancia al nitrito

Los resultados de este capítulo han sido parcialmente publicados como:

- Díaz, A.C.; Velurtas, M.S., Espino, M.L. & Fenucci, J.L. 2014. Effect of dietary astaxanthin on free radical scavenging capacity and stress tolerance of postlarvae shrimp *Pleoticus muelleri*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 62: 12326-12331.

### 3.1. Introducción

Desde la primera elucidación estructural del  $\beta$ -caroteno por Kuhn y Karrer en 1928-1930, alrededor de 750 carotenoides naturales se han notificado a partir de 2004 (Britton *et al.*, 2004). Las mejoras de los instrumentos analíticos como la RMN, MS, HPLC, etc., han permitido conocer la estructura de carotenoides muy pequeños presentes en la naturaleza (Maoka y Akimoto, 2008; Maoka, 2009b; Maoka, 2009a). Los carotenoides están entre los pigmentos naturales más comunes y son responsables de muchos de los tonos rojos, anaranjados y amarillos de las hojas, frutas y flores de las plantas, así como del color de algunas aves, insectos, peces y crustáceos (Stahl y Sies, 2003). Entre los 750 carotenoides reportados encontrados en la naturaleza, más de 250 son de algas o animales marinos (Britton *et al.*, 2004).

En particular, los animales marinos contienen varios carotenoides que muestran la gran diversidad estructural que existe (Maoka, 2009b; Maoka, 2009a; Liaaen-Jensen, 1990; Liaaen-Jensen, 1998; Matsuno, 2001; Matsuno, 1989; Matsuno e Hirao, 1989). Sin embargo, los carotenoides sólo son producidos por fotosíntesis por las plantas y algunas especies de algas, los crustáceos como muchos otros animales no son capaces de sintetizar estos pigmentos *de novo*, por lo tanto los que se encuentran en ellos se acumulan directamente de los alimentos (naturales o artificiales) o son productos de modificaciones metabólicas a través de diferentes reacciones (Maoka, 2011; Wade *et al.*, 2015). Las principales conversiones metabólicas de carotenoides encontrados en animales son la oxidación, reducción, translocación de los dobles enlaces, escisión oxidativa de los mismos y la escisión de los enlaces epoxi (Maoka, 2011), las cuales generan los productos intermediarios entre el  $\beta$ -caroteno y su producto más oxidado, la astaxantina. La ruta biosintética de estos compuestos en tejido de crustáceos ha sido estudiada en varias especies de crustáceos y puede resumirse en el siguiente esquema (fig. 3.1).

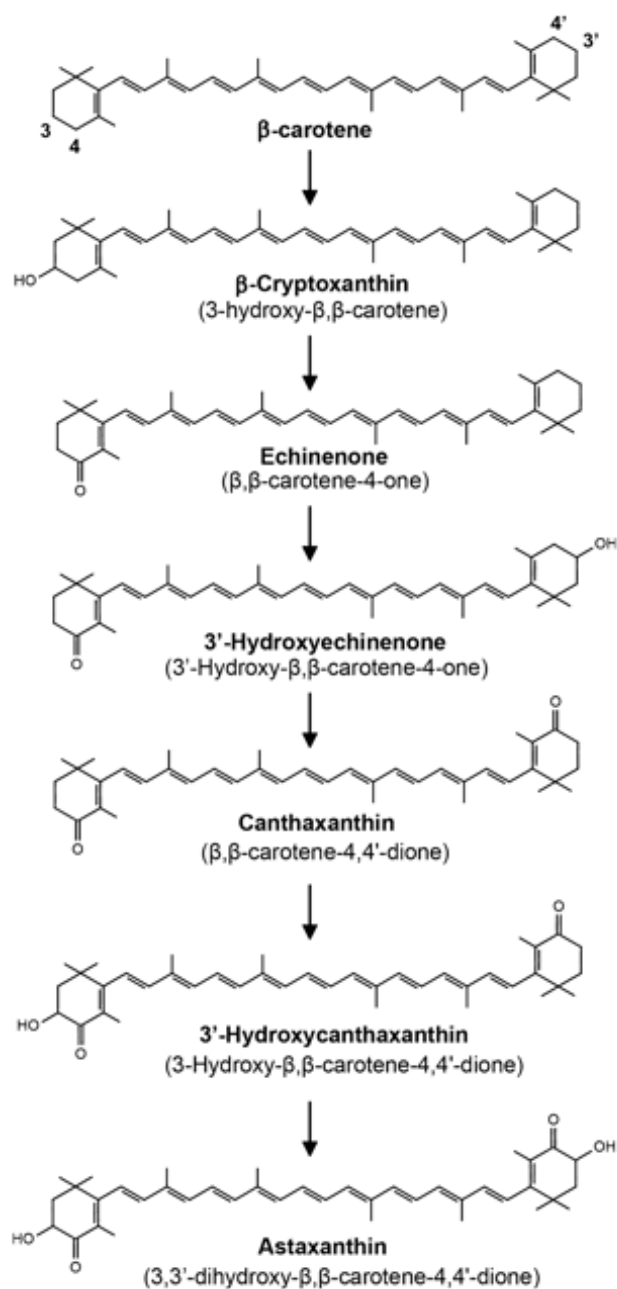


FIGURA 3.1: Diagrama esquemático del principal ruta de conversión metabólica desde al β-caroteno hasta la astaxantina en el tejido de crustáceos (Wade *et al.*, 2015)

Químicamente, la mayoría de los carotenoides son compuestos lipídicos tetraterpenoides, con cadenas de 40 átomos de carbono y formados por 8 unidades isoprenoides, de modo que la secuencia se invierte en el centro de la molécula (Meléndez-Martínez *et al.*, 2007). Debido a su carácter hidrofóbico, se encuentran en ambientes lipofílicos como las membranas celulares (Liang *et al.*, 2009), sin embargo, a través de reacciones de asociación con proteínas o glicosilación pueden encontrarse también en ambientes acuosos. Considerando los elementos químicos presentes en sus

moléculas, los carotenoides pueden dividirse en dos grupos: los carotenos que son puramente hidrocarburos y las xantofilas, que contienen además átomos de oxígeno debido a que se generan por oxidación de los carotenos, como puede apreciarse en la figura 3.1 (Halliwell y Gutteridge, 2001; Meléndez-Martínez *et al.*, 2007).

Los carotenoides son compuestos altamente insaturados, característica que le otorga la capacidad de extraer o donar  $e^-$  generando radicales libres (aniones o cationes), los cuales pueden reaccionar con el  $O_2$  y otras moléculas. De esta manera, los carotenoides pueden actuar como antioxidantes o prooxidantes; gracias a esta propiedad muchas de las acciones y funciones conocidas de los carotenoides se pueden atribuir directamente a sus propiedades físico-químicas (Olson y Krinsky, 1995).

El carotenoide más ampliamente distribuido en la naturaleza y presente en gran parte de los organismos marinos es la astaxantina (Li, Zhu *et al.*, 2011; Markou y Nerantzis, 2013; Zhang, Liu *et al.*, 2014; Ambati *et al.*, 2014). Este pigmento es un miembro de las xantófilas formado por dos anillos terminales unidos por una cadena de polieno. Además, esta molécula tiene dos carbonos asimétricos localizados en posición 3 y 3' del anillo  $\beta$ -ionone con un grupo hidroxilo (-OH) en cada extremo de la molécula. La astaxantina existe en esteroisómeros, isómeros geométricos, en forma libre y esterificada (Ambati *et al.*, 2014) y todas estas formas se encuentran en la naturaleza. Posee dobles enlaces conjugados, con grupos cetónicos e hidroxilos que le otorgan propiedades hidrofóbicas e hidrofílicas, es decir que incrementan su afinidad por la interfase lípido/agua en las membranas biológicas (Liang *et al.*, 2009; Skibsted, 2012). Los dobles enlaces conjugados del centro de la molécula no sólo le confieren el color sino que además actúan como antioxidantes por donación de  $e^-$  al reaccionar con radicales libres (RL) para convertirlos en productos más estables y terminar con la reacción en cadena producida por los RL sobre los lípidos (Ambati *et al.*, 2014). Además, debido a su estructura molecular y la posición que ocupa en la bicapa lipídica, la astaxantina proporciona una mejor protección contra los RL que otras xantófilas como la zeaxantina y que carotenos como el licopeno y el  $\beta$ -caroteno. Su afinidad por la interfase lípido/agua hace que se ubique en forma oblicua dentro de la membrana, lo cual disminuye la fluidez de la misma y, por lo tanto, dificulta la difusión de los RL hacia el interior de la célula (Liang *et al.*, 2009; Blasko *et al.*, 2008).

La astaxantina es el principal carotenoide encontrado en los crustáceos (Armenta y Guerrero-Legarreta, 2009) y les confiere su color característico, el cual aumenta su aceptación en el mercado alimenticio (Ju *et al.*, 2010; Parisenti *et al.*, 2011). Sin embargo, este no es su único beneficio, diversas investigaciones se han realizado para determinar los efectos fisiológicos de la incorporación de este pigmento en la dieta de los camarones.

Bajo condiciones de cultivo intensivas, la alimentación de los crustáceos se limita a las dietas artificiales, que aunque cubren sus necesidades nutricionales pueden carecer de importantes metabolitos bioactivos, es decir compuestos que no aportan a la nutrición del individuo, pero que de alguna manera benefician su salud a través de su actividad biológica dentro del organismo (Moral y Martínáz-Hernández, 2005). Los carotenoides pueden considerarse compuestos bioactivos, debido a que si bien no son esenciales para la nutrición de los crustáceos, son beneficiosos para su salud.

Como principal carotenoide en los tejidos de crustáceos, la astaxantina realiza funciones que incluyen pigmentación, fotoprotección, antioxidante y es una fuente de provitamina A (Britton, 2008). Entre los efectos positivos sobre diferentes parámetros estudiados en camarones peneidos, encontramos, por ejemplo, que la suplementación de las dietas de *Penaeus monodon* con astaxantina incrementan la resistencia tanto al estrés térmico y osmótico (Pan, Chien y Hunter, 2003) como a la exposición al amonio (Chien, Pan *et al.*, 2003), además de mejorar su crecimiento y supervivencia (Supamattaya *et al.*, 2005), y aumentar su tasa de reproducción (Huang *et al.*, 2008). Por su parte, Niu, Tian *et al.* (2009) encontraron que este pigmento puede incrementar el crecimiento en *Litopenaeus vannamei*, y más recientemente, Zhang, Liu *et al.* (2013) determinaron que la astaxantina dietaria mejora la tolerancia al estrés oxidativo en *Litopenaeus vannamei*.

Las prácticas de acuicultura intensiva con frecuencia someten a los animales a factores de estrés, como puede ser la acumulación de compuestos nitrogenados en el agua. La alta densidad de animales en los estanques de acuicultura se asocia con una gran producción de productos de desecho, entre los que se incluye el amoníaco excretado por los propios animales, con su potencial acumulación y transformación en nitritos a niveles tóxicos (Hargreaves, 1998). El nitrito es uno de los tóxicos más

comunes en estos sistemas de cultivo, su concentración se incrementa con el periodo de cultivo y puede alcanzar niveles perjudiciales para los animales (Tacon *et al.*, 2002). Su punto de entrada más común son las branquias (Jensen, 2003); por ello se ha sugerido que la observación de los cambios histológicos de las branquias pueden revelar respuestas adaptativas o alteraciones provocadas por la exposición a este tóxico (Mallatt, 1985; Frances *et al.*, 1998).

Experimentos de exposición a concentraciones crecientes de nitrito ambiental han mostrado que los camarones marinos bioacumulan nitrito en la hemolinfa (Chen y Chen, 1992; Chen y Cheng, 1995; Cheng y Chen, 2002), lo que provoca distintas alteraciones a los crustáceos en cultivo, tales como: una disminución de la supervivencia en larvas de *Scylla serrata* (Seneriches-Abiera *et al.*, 2007) y en adultos de *Litopenaeus vannamei* (Liao *et al.*, 2012), una producción excesiva de especies reactivas del oxígeno (ROS) e inhibición de las enzimas antioxidantes en *Macrobrachium nipponense* (Wang, Wang, Zhang *et al.*, 2004), y la disminución de la respuesta inmune por reducción en la fenoloxidasas en *Macrobrachium malcolmsonii* (Chand y Sahoo, 2006). Estos estudios demuestran que la exposición al nitrito genera un desequilibrio bioquímico que lleva a la producción excesiva de ROS y RL que no puede ser contrarrestado por el sistema de defensas antioxidante; este desequilibrio se conoce como estrés oxidativo (Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2004).

Un método muy útil de estimar el daño causado por el estrés oxidativo es medir las defensas antioxidantes extracelulares a través de la denominada capacidad antioxidante total (AT), que es la acción acumulativa de todos los antioxidantes presentes en los fluidos corporales, siendo un parámetro integrado más que una simple suma de antioxidantes medidos (Winston *et al.*, 2004; Paital y Chainy, 2010). La astaxantina es un potente antioxidante, que protege células y tejidos de los efectos perjudiciales de los RL y el oxígeno singlete previniendo del estrés oxidativo (Palozza *et al.*, 2008; Sowmya *et al.*, 2011). Su actividad secuestrante puede ser evaluada mediante el método de espectroscopia de resonancia de espín paramagnético electrónico (EPR) que es considerado como el método más preciso para la detección de radicales libres. La capacidad secuestrante de radicales se determina por la desaparición de 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH), un radical libre estable, con una señal distintiva



en el EPR (Díaz, Fernández-Gimenez *et al.*, 2004).

En los animales marinos, las principales enzimas antioxidantes generalmente exhiben mayor actividad en los órganos de biotransformación como son los órganos digestivos (Lemaire y Livingstone, 1993). Una de estas enzimas es la superóxido dismutasa, la cual es responsable de la eliminación de los radicales superóxido y está involucrada en mecanismos protectores en la lesión de los tejidos después del proceso oxidativo y fagocítico (Zhang y Wen, 2012). Esta respuesta tisular y celular puede detectarse en un estadio prematuro del daño, antes que se evidencie en el animal entero, por lo tanto el análisis histológico, por ejemplo el hepatopáncreas, es una herramienta muy útil para registrar el estado de salud del individuo. Además, el análisis histológico de este órgano se ha utilizado como un medio práctico para evaluar la condición nutricional de los camarones en cultivo, por su importancia como centro del metabolismo intermediario (Díaz, Sousa *et al.*, 2006; Kumaraguru Vasagam *et al.*, 2007; Fenucci, Díaz y Fernández-Gimenez, 2009). Asimismo, este órgano es considerado como el sitio de almacenamiento de estos pigmentos y la vía de transferencia a la hemolinfa (Flores *et al.*, 2007), debido a que juega un papel importante en la absorción de los carotenoides de la dieta y es también un indicador sensible del estado nutricional y de las enfermedades en varias especies de camarones (Al-Mohanna y Nott, 1989; Bautista *et al.*, 1994; Rosas *et al.*, 1995).

**Objetivo** El objetivo de este capítulo fue investigar la interacción entre la concentración de astaxantina adicionada en la dieta y la respuesta antioxidante en postlarvas de *P. muelleri* expuestas a nitrito. Para ello, se establecieron los siguientes objetivos particulares:

- Evaluar los efectos sobre el crecimiento, la supervivencia de las postlarvas.
- Analizar la morfología funcional del hepatopáncreas y de las branquias.
- Determinar la actividad antioxidante total (AT) del hepatopáncreas de las mismas.

## 3.2. Materiales y métodos

### 3.2.1. Experimento de alimentación y $LC_{50}$

Para determinar los efectos de la incorporación de astaxantina en la dieta de postlarvas de *P. muelleri*, se realizaron experimentos de alimentación de 30 días de duración con tres dietas conteniendo diferentes cantidades de astaxantina.

Posteriormente, fueron expuestas a diferentes concentraciones de nitrito en un ensayo estático de toxicidad aguda.

Las postlarvas de *P. muelleri* ( $15 \pm 0,004$ mg peso inicial) utilizadas fueron obtenidas de la hatchery de la Estación Nágera, Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras (CONICET-UNMdP), Mar del Plata. Los ensayos de alimentación fueron testeados por triplicado, utilizando 90 individuos para cada tratamiento. Los mismos se realizaron en acuarios a una densidad de 10 individuos por  $0,1m^2$ , los cuales contaban con aireación continua y un sistema de filtrado (a  $5\mu m$ ), además el 50 % del agua fue recambiada todos los días. Las condiciones experimentales fueron: fotoperiodo, 12h luz/12h oscuridad; temperatura,  $20 \pm 0,8^\circ C$ ; salinidad, 33; y pH 7.

Los tratamientos consistieron en tres dietas isoproteicas e isolipídicas (37 % de proteínas y 7.5 % de lípidos) suplementadas con 0; 100 y 300 mg de astaxantina/kg de dieta ( $C_0$ ;  $C_{100}$  y  $C_{300}$ , respectivamente). Todos los ingredientes fueron mezclados y peletizados utilizando el método de extrusión en frío (Díaz, Fernández-Gimenez *et al.*, 2004), luego se secaron durante 24 horas a  $50^\circ C$  (tabla 3.1). Las dietas fueron preparadas cada dos semanas para evitar la descomposición de los carotenoides durante el almacenaje (a  $-20^\circ C$ ). Para confirmar la estabilidad de los carotenoides en ese tiempo, se realizaron mediciones con un espectrofotómetro ultravioleta-visible (UV-visible) explorando el espectro entre 200 y 750 nm.

TABLA 3.1: Composición porcentual de la dieta control.

Ingredientes (g/100g)	C <sub>0</sub>
Harina de pescado (65 % proteína cruda) <sup>a</sup>	48
Harina de soja (42 % proteína cruda) <sup>b</sup>	17
Almidón	20
Proteínas de calamar concentradas	1
Salvado	8,5
Aceite de pescado	2
Soluble de pescado	2
Lecitina de soja	0,5
Colesterol	0,5
Suplemento vitamínico <sup>c</sup>	0,5

<sup>a</sup> Agustinier S.A. Mar del Plata, Argentina.

<sup>b</sup> Melrico S.A. Argentina

<sup>c</sup> g/kg: colecalciferol 1,8; tiamina 8,2; riboflavina 7,8; piridoxina 10,7; pantotenato de calcio 12,5; biotina 12,5; niacina 25,0; ácido fólico 1,3; B12 HCl 1,0; ácido ascórbico (Rovimix Stay C) 39,1; menadiona 1,7; inositol 0,3; colina clorada 0,2;  $\alpha$ -tocoferol acetato 75,0; vitamina A acetato 5,0.

Todos los grupos de animales fueron alimentados *ad libitum* una vez al día. Luego de terminado el experimento de alimentación, las postlarvas sobrevivientes de cada tratamiento fueron pesadas y transferidas a frascos de vidrio, colocando cuatro postlarvas en cada uno por triplicado para el ensayo estático de toxicidad aguda de nitrito (NO<sub>2</sub>Na<sub>2</sub>). Se prepararon soluciones de nitrito con agua de mar a concentraciones de 0; 10; 20; 40; 80; 100; 120; 160 y 200 mg/l. Durante este tiempo los animales no fueron alimentados y la mortalidad fue monitoreada en intervalos de 24 horas durante 5 días (96 horas).

### 3.2.2. Estudio histológico del hepatopáncreas y las branquias

Al finalizar el ensayo de toxicidad aguda, algunos individuos completos de cada tratamiento y del control fueron fijados en fluido Davison por 24hs (etanol, formol,

ácido acético y agua) (Bell y Lightner, 1988), posteriormente se deshidrataron en concentraciones crecientes de etanol, alcohol butílico y se incluyeron en butil-parafina y parafina. Se efectuaron cortes de 5  $\mu\text{m}$  y fueron coloreados con hematoxilina-eosina (H&E).

### 3.2.3. Actividad antioxidante total (AT)

Para la determinación la actividad antioxidante total (AT), las postlarvas de cada tratamiento y el control se liofilizaron y conservaron a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, 25 mg de tejido liofilizado de cada muestra fueron mezclados con 1 ml de cloroformo bajo atmósfera de argón. Cada mezcla de reacción contenía 50  $\mu\text{l}$  de muestra y 50  $\mu\text{l}$  de DPPH ( $2,8 \times 10^{-5} \text{ M}$ ). Se preparó un control o blanco reemplazando el volumen de solución del tejido por cloroformo y se observó que el espectro en EPR de dicha solución permanece inalterada durante el tiempo empleado en las mediciones. Las muestras se colocaron en tubos de cuarzo de 4 mm de diámetro interno para conseguir una afinación adecuada en el equipo, se trabajó en atmósfera de argón y a una temperatura constante de 293K. El análisis en el equipo se realizó a intervalos de 60 minutos.

### 3.2.4. Análisis estadísticos

Los datos se informaron como la media  $\pm$  desviación estándar. La concentración letal media ( $LC_{50}$ ) del nitrito se obtuvo a partir de un análisis Probit calculado con el programa informático XLSTAT 2010. La prueba de  $\chi^2$  fue utilizada para probar la bondad de ajuste de la línea de Probit estimada. En todos los casos, la significación se estableció como  $p < 0,05$ .

## 3.3. Resultados

Luego de 30 días de experimentación con las dietas  $C_0$ ,  $C_{100}$  y  $C_{300}$ , la ganancia en peso varió entre 172 y 190 %, sin diferencias significativas entre los tratamientos. En el caso de la supervivencia, los valores se determinaron entre 71 % y 82 %, también

sin diferencias significativas entre ellos, incluso con las dietas suplementadas con astaxantina.

En la tabla 3.2 se muestran los resultados del ensayo de toxicidad aguda al nitrito. Los valores de  $LC_{50}$  al nitrito a las 96 horas fueron 76,33; 89,70 y 156,96 mg/l para los langostinos provenientes de los tratamientos  $C_0$ ;  $C_{100}$  y  $C_{300}$ , respectivamente.

TABLA 3.2: Concentración letal media ( $LC_{50}$ ) al nitrito luego de 96 horas de exposición, para *P. muelleri* alimentado con dietas experimentales.

Dieta	$LC_{50}(\text{mg } L^{-1})$	Intervalos de confianza (95 %)		$\chi^2$
		Límite inferior	Límite superior	
$C_0$	76.3	51.1	61.5	0.28
$C_{100}$	89.7	13.1	55.4	0.46
$C_{300}$	157	9.4	57.8	0.51

En la figura 3.2 se muestra la histología del hepatopáncreas de *P. muelleri*. Todos los animales sometidos a los tratamientos con nitrito mostraron alteraciones tisulares, comparados con la condición histológica inicial. En los correspondientes al tratamiento control (sin aditivo de nitrito) muestran la morfología normal del hepatopáncreas, compuesto por túbulos con un epitelio simple formado por cuatro tipos celulares claramente identificables, las embrionarias (E), las fibrilares (F), las absorptivas (R) y las digestivas (B) (fig. 3.2(a)). La principal alteración histopatológica fue la retracción del epitelio dentro de la capa de tejido conectivo laminar que rodea cada túbulo. Por otro lado, algunos túbulos tuvieron una reducción en el número y el tamaño de las vacuolas de almacenamiento lipídico (B), mientras que otros túbulos estaban completamente desprovistos de células epiteliales y con el lumen dilatado. Ambos tipos de túbulos contenían células epiteliales desprendidas y desechos celulares. En comparación, el análisis histológico del hepatopáncreas del grupo de langostinos tratados con niveles más elevados de nitrito mostró grados variables de patología tisular. Se observó en la muestra de animales alimentados con astaxantina ( $C_{300}$ ) y sometidos a la mayor concentración de nitrito que la estructura general del órgano estudiado fue menos afectada que la muestra de aquellos alimentados con  $C_0$  (fig. 3.2(d)).

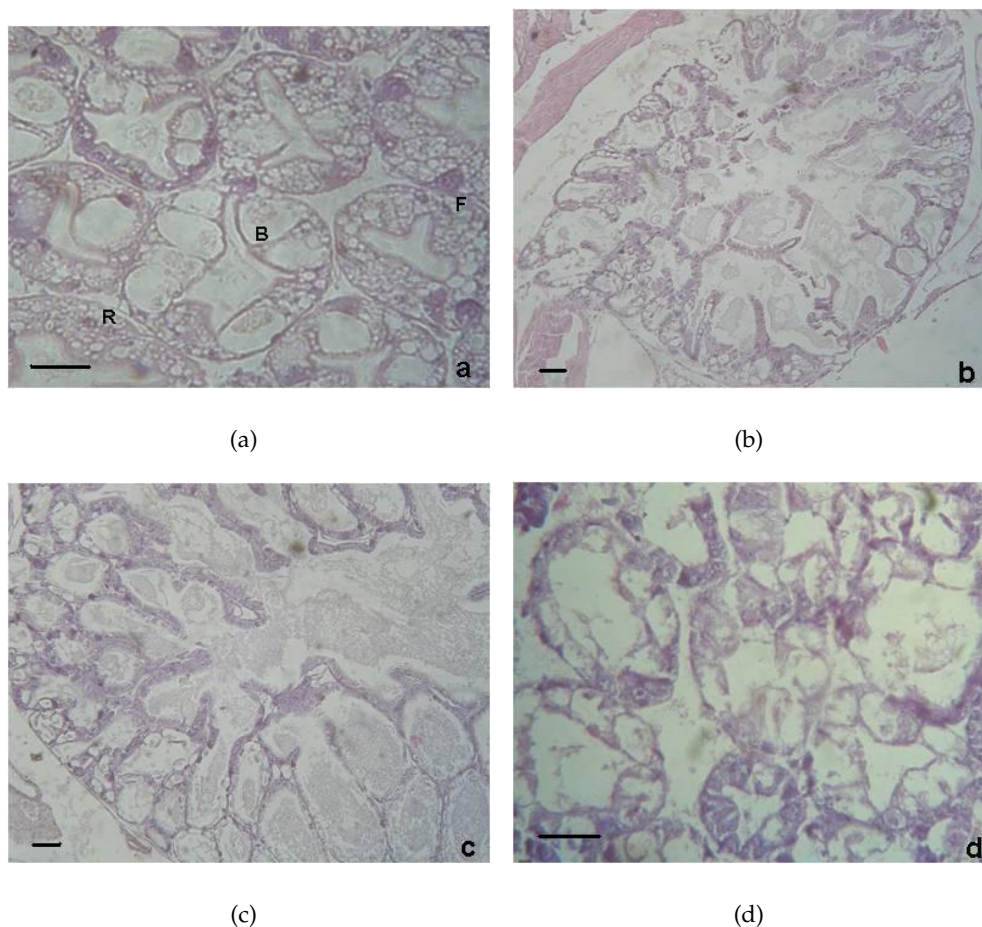


FIGURA 3.2: Corte transversal de hepatopáncreas de postlarvas de *P. muelleri* teñidas con H&E

**3.2(a)** Tratamiento control (sin exposición a nitrito) muestra la histología normal de los túbulos, con las células B (digestivas), F (fibrilares) y las R (absortivas), la barra corresponde a 50µm **3.2(b)** Tratamiento con C<sub>300</sub> and 80mg/l nitrito, la barra corresponde a 200µm. **3.2(c)** Tratamiento C<sub>0</sub> con 10mg/l nitrito, la barra corresponde a 100µm. **3.2(d)** Tratamiento C<sub>0</sub> con 80mg/l nitrito, la barra corresponde a 50µm.

Las alteraciones histológicas sobre el tejido branquial se muestran en la figura 3.3. Para los animales alimentados con la dieta sin astaxantina (C<sub>0</sub>), el examen histológico demostró que la primera señal de deterioro de las branquias se observa a 40 mg/l de nitrito. La exposición al nitrito causó edema de las lamelas, desorganización del epitelio y disrupción de la cutícula, lo cual produjo la pérdida de la estructura lineal de la laminilla. Sin embargo, aquellos individuos alimentados con la mayor cantidad de astaxantina (C<sub>300</sub>) y expuestos a 40 mg/l de nitrito, no presentan alteraciones en las branquias. En el caso de los animales alimentados con esta cantidad de astaxantina, los mayores cambios histológicos se observaron a 80 mg/l de nitrito.

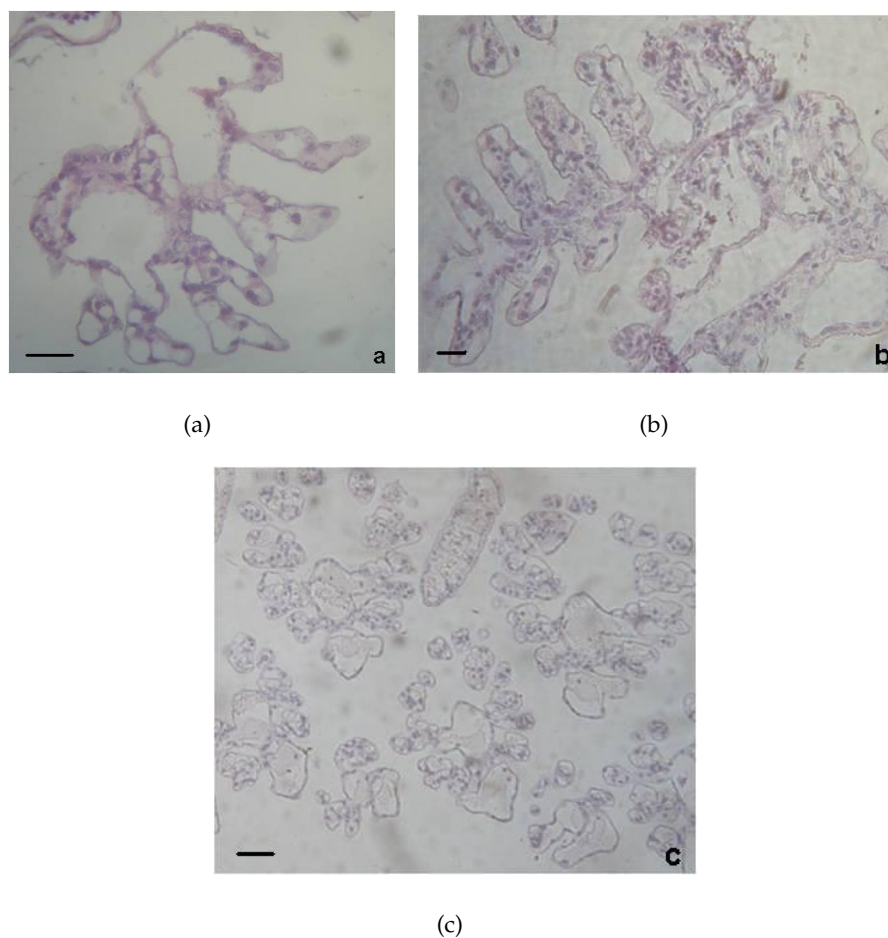
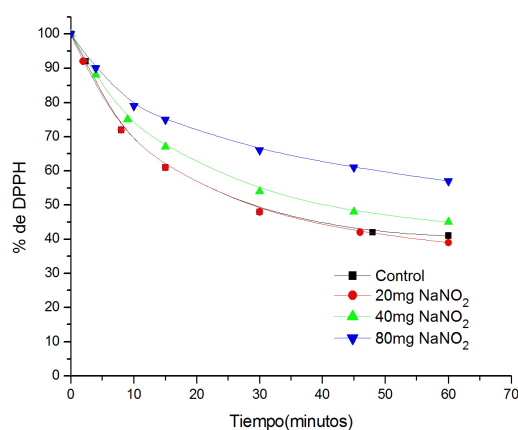


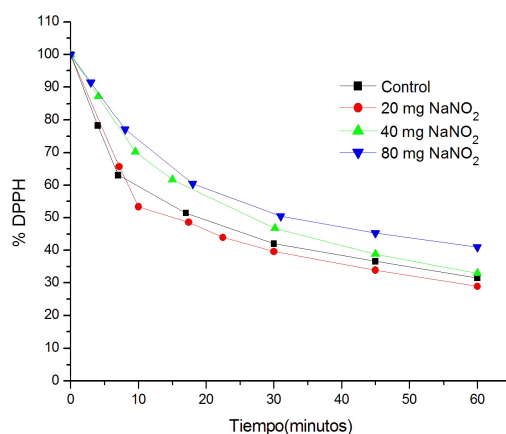
FIGURA 3.3: Vista general de las branquias de postlarvas de *P. muelleri*.

3.3(a) Dieta  $C_0$  sin nitrito, la barra corresponde a 50  $\mu\text{m}$  3.3(b) Dieta  $C_0$  40 mg/l nitrito, la barra corresponde a 100  $\mu\text{m}$  3.3(c) Dieta  $C_{300}$  80 mg/l nitrito, la barra corresponde a 200  $\mu\text{m}$ .

En la figura 3.4, se muestra la cinética de reacción del DPPH de los homogenatos de tejidos hepatopancreáticos de las postlarvas alimentadas con  $C_0$  (3.4(a)) y  $C_{300}$  (3.4(b)) expuestos a diferentes concentraciones subletales de nitrito (0; 20; 40 y 80 mg/l). En la figura 3.4(a) la señal decae entre 38 y 56 % a los 60 minutos de reacción. La curva fue similar para el tratamiento control y el expuesto a 20mg/l de nitrito, y la actividad más lenta se determinó para los expuestos a 80 mg/l, sin embargo no se determinó diferencias significativas entre los tratamientos. En la figura 3.4(b) el decaimiento en la concentración de DPPH varió entre 29 y 41 % a los 60 minutos de reacción, y no se establecieron diferencias significativas entre las diferentes concentraciones de nitrito.



(a)



(b)

FIGURA 3.4: Cinética de reacción del tejido hepatopancreático con el radical DPPH.  
 3.4(a) C<sub>0</sub> (sin astaxantina). 3.4(b) C<sub>300</sub> (300mg/kg de astaxantina).

Los efectos de la dosis y el tiempo fueron más evidentes en los langostinos expuestos a 80 mg/l de nitrito; por ello, fue medida y comparada la actividad secuestrante del radical DPPH de los extractos de individuos expuestos a esa concentración de nitrito y alimentados con C<sub>0</sub>; C<sub>100</sub> y C<sub>300</sub> (figura 3.5). Todos mostraron capacidad secuestrante, aunque se observaron algunas diferencias entre los animales C<sub>0</sub> (43 %) y los C<sub>100</sub> y C<sub>300</sub>, los cuales tuvieron una mayor actividad (62 y 59 %, respectivamente).



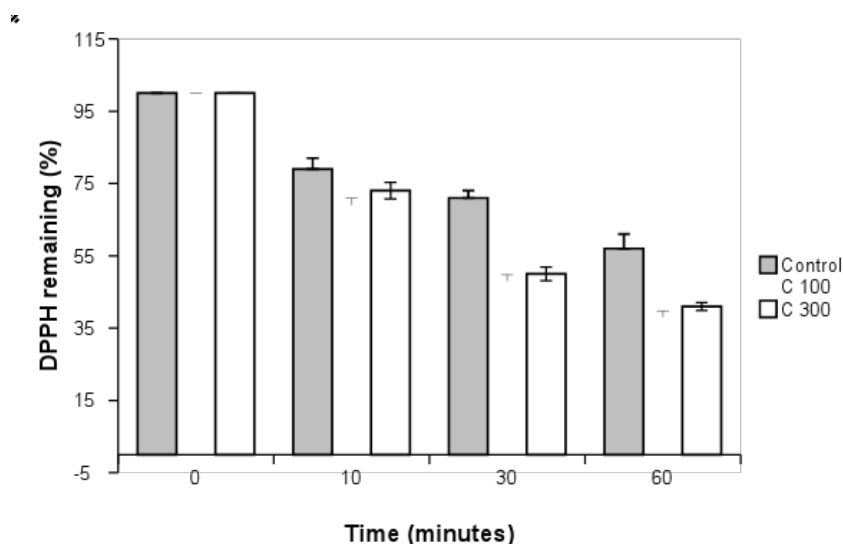


FIGURA 3.5: Efectos secuestrante del radical DPPH seguido durante 60 minutos. Pool de hepatopáncreas de animales expuestos a 80 mg de nitrito y alimentados con las dietas adicionadas con 100 y 300 mg de astaxantina ( $C_{100}$  y  $C_{300}$ , respectivamente) y sin astaxantina ( $C_0$ ). Las barras verticales representan la desviación estándar de cada conjunto de datos ( $n=3$ )

### 3.4. Discusión

Los resultados obtenidos luego de 30 días de experimentación con los piensos  $C_0$ ,  $C_{100}$  y  $C_{300}$ , no evidenciaron un aumento en el porcentaje de incremento en peso en *P. muelleri*, resultados similares han sido obtenidos para otros camarones peneideos alimentados con piensos suplementados con carotenoides (Chien y Shiau, 2005; Pan, Chien y Cheng, 2001). Sin embargo, algunos estudios mostraron que la astaxantina en la dieta tiene un efecto beneficioso en la supervivencia del camarón. En el estudio de Niu, Tian *et al.* (2009) se determinó que el crecimiento y la supervivencia en *Litopenaeus vannamei* incrementó cuando se alimentaron con dietas suplementadas con astaxantina (100-400 mg/kg) en relación con camarones alimentados con la dieta de control y no hubo diferencias entre los tres tratamientos dietéticos suplementados con astaxantina. Sin embargo, en *Marsupenaeus japonicus*, se observó una supervivencia similar entre camarones alimentados con diferentes concentraciones de pigmento, lo que indica que el suplemento con 100 mg/kg de carotenoide no tuvo ningún beneficio adicional en la supervivencia del camarón comparado con 50

mg/kg (Chien y Shiau, 2005). Para *P. muelleri*, no se encontraron diferencias significativas en la supervivencia entre los tratamientos, incluso con alimentos suplementados con astaxantina; por lo tanto, el uso de carotenoides como aditivo nutricional no sería necesario para esta especie si se les alimenta con dietas que contienen harinas animales como el pescado o el calamar o la vitamina A en su composición.

Los valores de  $LC_{50}$  al nitrito fueron 76,3; 89,7 y 157 mg/l para los alimentados con  $C_0$ ,  $C_{100}$ , y  $C_{300}$ , respectivamente. Este aumento de la resistencia al estrés ambiental en las postlarvas de camarones penaeoideos se asoció con un aumento en la dieta y la astaxantina corporal (Chien, Pan *et al.*, 2003; Chien y Shiau, 2005). Estudios realizados en varios animales acuáticos muestran que el nitrito es un disruptor de múltiples funciones fisiológicas, incluidas, respiratorias, cardiovasculares, endócrinas y procesos excretores y de equilibrio iónico (Jensen, 2003). Los resultados de este trabajo mostraron que la astaxantina mejora la salud de las postlarvas en términos de resistencia al estrés por nitrito debido a que la concentración letal media ( $LC_{50}$ ) de nitritos aumenta con concentraciones más altas de la dieta de astaxantina. Los valores de  $LC_{50}$  de 96 horas determinados en este trabajo para langostinos alimentados con  $C_0$ ,  $C_{100}$ , y  $C_{300}$  son significativamente más bajos que los resultados reportados por Lin y Chen (2003) para los juveniles de *L. vannamei* (322 mg/l), pero superiores a las encontradas para el camarón de agua dulce *Macrobrachium rosenbergii*, con valores entre 8,8 y 12,9 mg/l. Estas comparaciones muestran que cuando se evalúan los efectos toxicológicos del nitrito en los ecosistemas acuáticos, se puede concluir que los animales marinos son más tolerantes a la toxicidad de los nitritos que los de agua dulce (Camargo y Alonso, 2006).

Respecto del análisis histológico de los langostinos tratados con elevados niveles de nitrito, éste mostró que la estructura general de los órganos estudiados fue menos afectada en los animales alimentados con 300 mg/l de astaxantina que aquellos alimentados sin el pigmento. Estos resultados permiten inferir que la adición de astaxantina en el alimento disminuye el daño en los animales sometidos a concentraciones de 80 mg/l de nitrito. Todos estos cambios sugieren que los niveles de nitrito afectan negativamente la salud aun cuando los signos externos, como el crecimiento y la supervivencia, no son evidentes. La observación del tejido branquial,

en el tratamiento control sin astaxantina, mostró edematización del epitelio causado por la exposición al nitrito como respuesta adaptativa a concentraciones subletales de este poluyente (Romano y Zeng, 2009). En relación a las alteraciones en el hepatopáncreas, según Vogt (1990), el proceso de descamación en el hepatopáncreas de *P. monodon* comienza con la lisis celular, particularmente las células R sobresalen en pequeñas extensiones basolaterales, empujando las células dañadas al lumen tubular, generando ulceraciones. En el presente trabajo, la descamación degenerativa del epitelio tubular del hepatopáncreas de *P. muelleri* fue una característica patológica observada con todas las concentraciones de nitrito ensayadas. Esta alteración también se observó en otros crustáceos marinos aclimatados a salinidades bajas, como *Artemesia longinaris* (Masson *et al.*, 2012) y *P. muelleri* (Cuartas *et al.*, 2003) y en el camarón de agua dulce *Palaemonetes argentinus* en condiciones de hipersalinidad (Díaz, Sousa *et al.*, 2010). El aumento de la descamación producida por diferentes factores de estrés resultó en una alta tasa de pérdida celular que no permite la restitución del tejido dañado. El hepatopáncreas desempeña un papel importante en el metabolismo de los lípidos; las modificaciones observadas en las células R sugieren que el langostino no metaboliza los alimentos normalmente, lo que puede ser debido a la mayor demanda de energía en respuesta al estrés por las altas concentraciones de nitrito (Kuhn *et al.*, 2010).

Existen algunas explicaciones sobre los mecanismos de reacción de eliminación de radicales libres por parte de los carotenoides *in vitro* (Mendiara *et al.*, 2009), pero es difícil estar seguro cual es el papel antioxidante que los carotenoides cumplen en los sistemas biológicos y la posible interferencia con tóxicos como el nitrito. En el presente trabajo, el aumento de la neutralización de los radicales generados por el estrés a la exposición de nitrito, se atribuyó a que el contenido más alto de astaxantina en la dieta (300 mg/kg) promueve la formación de sustancias protectoras. La astaxantina como miembro de la familia de los carotenoides reduce la tasa de oxidación (Pu *et al.*, 2010), en consecuencia desempeña un papel importante en la salud animal como antioxidante a través de la inactivación de los radicales libres producidos tanto por la actividad celular normal como por la acción de diversos factores estresantes (Chew, 1995).

Un trabajo previo sobre *P. muelleri* demostró que los tejidos de los estadios postlarvales (con mayores concentraciones de carotenoides en su composición) registraban un mayor porcentaje de decaimiento del DPPH en el tiempo, debido probablemente a que los radicales se consumen en el tejido a una velocidad que depende de la cantidad de sustancias protectoras (Díaz, Velurtas *et al.*, 2013). La larga controversia sobre la función de los carotenoides como antioxidantes puede estar relacionada con la extrapolación de propiedades determinadas *in vitro* a sistemas biológicos más complejos, donde otros factores, como la organización espacial y la interacción con otros antioxidantes, se vuelven importantes (Liang *et al.*, 2008). El nitrito ejerce parte de su toxicidad a través de la formación de reactivos intermedios de oxígeno (ROIs) que son capaces de atacar a casi todas las biomoléculas presentes en su vecindad, causando modificación de proteínas, peroxidación de lípidos y daño al ADN, un ejemplo de ello son los resultados obtenidos por Wang, Wang y Zhang (2006), quienes establecieron que las actividades de las tres principales enzimas antioxidantes (glutación peroxidasa, superóxido dismutasa y catalasa) responsables de combatir los efectos de las ROIs disminuyeron significativamente en respuesta a los niveles de nitrito ambiental en *L. vannamei*. Otra particularidad de los carotenoides polares, como la astaxantina, es que se localizan perpendicularmente en la membrana plasmática contribuyendo a la protección de los lípidos insaturados de los efectos adversos de los oxidantes (Skibsted, 2012). Los resultados del presente trabajo muestran una relación entre la suplementación de alimentación de carotenoides y la capacidad protectora de los tejidos frente a la concentración de nitrito. Chien, Pan *et al.* (2003) sugieren que la astaxantina es un nutriente "semi-esencial" para *P. monodon*, principalmente cuando el animal está bajo estrés fisiológico. Apoyando sus resultados, en el presente trabajo se observó un aumento de la capacidad antioxidante en *P. muelleri* alimentado con dietas suplementadas con astaxantina y expuestos a nitrito.

Uno de los aspectos más importantes de este estudio es la posibilidad de optimizar las técnicas de cultivo de esta especie, con el diseño de alimentos más eficientes. El uso de sustancias bioactivas, como los aditivos nutricionales, para mejorar el rendimiento de la cría de langostino está recibiendo cada vez más atención, y se están

---

haciendo esfuerzos para definir el papel de la astaxantina como suplemento dietario. La adición de pigmentos carotenoides como aditivos bioactivos, que afectan a procesos fisiológicos y moleculares bajo condiciones controladas, es necesario debido a que no pueden ser sintetizado *de novo* por estas especies. Se puede concluir que estos compuestos actúan como protectores del nitrito ambiental en condiciones de cultivo. Sin embargo, se necesitan más estudios para identificar los radicales libres que contribuyen a las actividades antioxidantes totales de los carotenoides en diferentes condiciones fisiológicas y para determinar la relación entre sus propiedades como atrapadores de radicales.



## Capítulo 4

# Estudio de la actividad antioxidante del extracto de *Undaria pinnatifida* y su utilización como aditivo funcional en la dieta de camarones peneidos

Los resultados obtenidos en este capítulo han sido parcialmente publicados como:

- Díaz, A.C.; Espino, M.L.; Arzoz, N.S.; Velurtas, S.M.; Ponce, N.M.A.; Stortz, C.A. & Fenucci, J.L. 2017. Free radical scavenging activity of extracts from seaweeds *Macrocystis pyrifera* and *Undaria pinnatifida*: applications as functional food in the diet of prawn *Artemesia longinaris*. Lat. Am. J. Aquat. Res., 45(1): 104-112.

### 4.1. Introducción

Las macroalgas han sido parte de la dieta humana por miles de años, esta afirmación se basa en las evidencias arqueológicas que demuestran el consumo de algas desde hace 14.000 años en Chile (Dillehay *et al.*, 2008) y más recientes en China (300 A.C.) e Irlanda (600 A.C.). La cosecha global de macroalgas en 2013 fue de 6,7 billones de

dólares, de los cuales alrededor del 95 % fue producido por maricultura (FAO *et al.*, 2015), con China e Indonesia como principales productores. De toda la producción el 38 % fue destinado al consumo humano, sin contar el consumo adicional de hidrocoloides (agar, alginatos, carragenos) usados como agentes espesantes en alimentos y bebidas. Si bien las algas son más comúnmente utilizadas como un recurso alimenticio en naciones como Japón, China y Corea, su uso culinario se está extendiendo a Occidente incluyendo países de Sudamérica y Estados Unidos (Bocanegra *et al.*, 2009); esta ganancia de popularidad de las algas para consumo humano o animal (Plaza *et al.*, 2008) se debe a que pueden ser una fuente natural de compuestos bioactivos. La tendencia actual de la demanda nutricional de los productos derivados de algas, se orienta a su uso como aditivos alimenticios. Además de su valor nutricional, las algas se comercializan cada vez más como “alimentos funcionales” o “nutraceuticos”, estos términos no tienen un estatus legal en muchos países, pero describen alimentos que son beneficiosos para la salud, por ejemplo como antiinflamatorios o inmunológicos (Bagchi, 2006; Gupta y Abu-Ghannam, 2011; Hafting *et al.*, 2012).

La composición química de las algas marinas depende de la especie, lugar de cultivo, condiciones atmosféricas y periodo de recolección. Desde un punto de vista nutricional, las algas son muy interesantes por su alto contenido en fibras dietarias (33-50 % peso seco) (Kraan, 2012), por ser una fuente importante de proteínas (pardo 5-24 %; rojas y verdes 10-47 %) (Mohamed *et al.*, 2012), minerales (8-40 %) (Taboada *et al.*, 2013), y por su bajo contenido lipídico (1-2 %) (Rupérez y Saura-Calixto, 2001). Particularmente la cantidad de fibras que contienen las algas es inusualmente elevada; las mismas son carbohidratos que no pueden ser digeridos por los humanos o animales. Sin embargo, esta definición es muy amplia y sólo se basa en su composición química y métodos analíticos para su detección, sin contemplar su actividad biológica (Dai y Chau, 2017). Debido a esto, no existe un consenso sobre su definición entre los científicos y las agencias reguladoras. Las fibras dietarias son consideradas como nutrientes y comprenden los carbohidratos y la lignina no digeribles que son intrínsecos de las plantas intactas; por su parte Medeiros y Wildman (2013) consideran que hay una fracción de carbohidratos no digeridos que tienen



efectos fisiológicos aparentemente beneficiosos en seres humanos más allá de la nutrición, a las cuales llaman fibras funcionales; por lo tanto, ellos hablan de fibras totales a la suma de las fibras dietarias y funcionales. Finalmente, como no existen métodos analíticos que puedan diferenciarlas (EFSA 2010), Jones (2014) definió a las fibras dietarias como aquellas no fermentadas o parcialmente fermentadas que generan beneficios fisiológicos, a través de vías físicas o químicas. En este punto, cabe aclarar que cuando en esta tesis se hable de fibras dietarias se hará referencia a esta definición.

En base a lo expuesto, se puede decir que las fibras dietarias son muy diversas en su composición y estructura química, así como en sus propiedades fisicoquímicas, habilidad para ser fermentadas por la flora intestinal y sus efectos biológicos en animales y humanos. Las fibras dietarias encontradas en las algas marinas, se clasifican en dos tipos aquellas insolubles en agua tales como la celulosa, mananos y xilanos, y las solubles en agua como los agares, el ácido algínico (alginato), fucanos y laminarianos (Kraan, 2012). Todas ellas son polímeros que forman la pared celular y la abundante matriz extracelular de los tres principales grupos de algas: las pardas (Phaeophyceae), rojas (Rhodophyta) y verdes (Chlorophyta); sin embargo, aquellas fibras solubles en agua presentan otra característica que las hace muy interesantes, poseen en su estructura química grupos sulfatados (Popper *et al.*, 2011). Estos grupos sulfatados son los que permiten la formación de moléculas con diferentes estructuras y les confieren propiedades beneficiosas (Castro *et al.*, 2006). Las algas como organismos fotosintéticos, están expuestas a una combinación de luz y altas concentraciones de oxígeno que pueden provocar la formación de radicales libres y otros agentes oxidantes fuertes, pero la ausencia de daños oxidativos en sus membranas sugiere que han desarrollado potentes mecanismos de protección (Mark, Potin *et al.*, 2016). Muchos autores han comprobado que los polisacáridos sulfatados presentan actividad antioxidante *in vitro* (Li, Lu *et al.*, 2008; Cofrades *et al.*, 2010; Mark, Hamid *et al.*, 2013), pudiendo ser considerados como potentes antioxidantes potenciales a incluir en los alimentos.

En las algas pardas, los polisacáridos sulfatados que se encuentran son el alginato y el fucoïdan (Bold y Wynne, 1985; Popper *et al.*, 2011), ellos proporcionan fuerza y

flexibilidad, mantienen el equilibrio iónico y evitan la desecación (Kraan, 2012). Los fucoidanos contienen principalmente L-fucosa sulfatada y proporciones variables de mosacáridos como galactosa, manosa, xilosa, glucosa, ramnosa y ácidos urónicos (Usov y Bilan, 2009; Kraan, 2012), que pueden alcanzar hasta el 40 % peso seco del alga (Holdt y Kraan, 2011) y son fácilmente extraíbles por métodos acuosos o soluciones ácidas (Berteau y Mulloy, 2003; Ponce *et al.*, 2003).

Desde que Kylin aisló por primera vez el fucoidan en 1913, la estructura del fucoidan de diferentes algas pardas ha sido estudiada por varios autores en los últimos años. Los primeros estudios se realizaron sobre el fucoidan de *Fucus vesiculosus*; este tiene una composición química simple compuesta por unidades de fucosa unidas por uniones  $\alpha$  (1,2) y varios grupos sulfatados localizados en la posición C-4, dicho modelo fue aceptado por 40 años (Conchie y Percival, 1950; O'Neill, 1954). Patankar en 1993 revisó este modelo y sugirió que la estructura central del fucoidan de *F. vesiculosus* es un polímero de unidades de fucosa unidos en la posición  $\alpha$  (1,3) con grupos sulfatos en la posición C-4 y unidades de fucosa unidas al polímero cada 2 o 3 residuos formando puntos de ramificación (Figura 4.1). Patankar, también explicó las posibles razones de las diferencias observadas con Conchie; en primer lugar el método de extracción fue distinto, Conchie utilizó agua caliente y Patankar ácido; en segundo lugar, el método de metilación para los análisis fue diferente; y finalmente Conchie analizó la estructura de acuerdo a las propiedades químicas de los productos metilados y Patankar confirmó los productos metilados por GC-MS (cromatografía gaseosa acoplado a masa) (Li, Lu *et al.*, 2008).

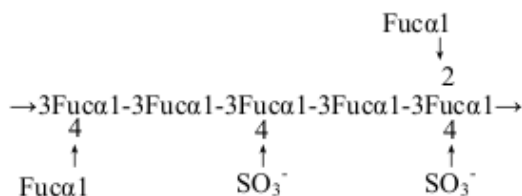


FIGURA 4.1: Modelo de la estructura del fucoidan según Pankter (Li, Lu *et al.*, 2008)

Sin embargo, la composición química de la mayoría de los fucoidanes es más compleja, no sólo tienen fucosa y sulfatos, también contienen otros monosacáridos (manosa, galactosa, xilosa, etc.) y ácido urónico, incluso grupos acetilos y proteínas. El

primero de ellos en ser reportado fue el de *Macrocystis pyrifera* en 1962, Schweiger determinó que este polisacárido aislado tenía una proporción de fucosa a galactosa 18:1 y trazas de xilosa. Desde entonces, otros azúcares tales como manosa, glucosa, xilosa y ácido glucurónico se han encontrado en la composición de fucoïdanos de diferentes algas, lo cual dificulta el análisis estructural (Li, Lu *et al.*, 2008). Sumado a esto, se han encontrado una amplia diversidad de sitios de unión entre estas moléculas; en consecuencia, la gran variabilidad de parámetros en el proceso de extracción de los fucoïdanos, no solo se ve reflejado a través de diferencias entre los azúcares componentes sino también en la variedad de uniones y modos de sustitución de sus componentes (Rabanal Atalaya, 2015).

Las técnicas pueden o no ser lo suficientemente selectivas, por lo tanto es necesario realizar algunos estudios químicos que nos aseguren que los extractos contengan los compuestos deseados. La espectroscopia de absorción molecular en el infrarrojo con transformación de Fourier (FTIR) es una herramienta muy útil que permite la caracterización preliminar de un compuesto orgánico, a partir de ciertas bandas específicas de absorción que aparecen en el rango de frecuencias de  $4000\text{-}650\text{ cm}^{-1}$  (número de onda) del espectro infrarrojo (Gómez-Ordóñez y Rupérez, 2011). Debido a que no existen, teóricamente, dos compuestos que absorban exactamente en las mismas frecuencias, esta técnica ha permitido la identificación de los principales polisacáridos asociados a la pared celular y a los espacios intercelulares de algas pardas (Gómez-Ordóñez y Rupérez, 2011). Otra ventaja de esta técnica es que permite determinar de forma rápida y sencilla el número y la posición de los grupos sulfato en los polisacáridos, pudiendo diferenciar bandas características de sulfatos en posición axial o ecuatorial dentro de la molécula (Li, Lu *et al.*, 2008), un factor importante que determina la actividad biológica en los mismos. Si bien, el FTIR provee una gran ayuda para conocer los enlaces químicos de las moléculas, dando una información general sobre los grupos funcionales presentes en una muestra, la cromatografía gaseosa (CGL) es un método más adecuado para tener un conocimiento preciso de la composición de un extracto.

Estos y otros métodos analíticos se han utilizado en los últimos años para determinar la estructura del fucoïdan obtenido del alga parda *Undaria pinnatifida*. Dichos

estudios coinciden en que este polisacárido está formado principalmente por residuos de fucosa y galactosa en cantidades variables y una menor proporción de los monosacáridos manosa, xilosa, glucosa, ramnosa y ácidos urónicos (Hu *et al.*, 2010; Synytsya *et al.*, 2010). Los estudios de espectroscopia infraroja (IR) y resonancia magnética nuclear (NMR) establecieron que este fucoideano es un galactofucano sulfatado compuesto por  $\beta$ -D-galactopiranosas y  $\alpha$ -L-fucopiranosas parcialmente acetiladas (Synytsya *et al.*, 2010), las uniones detectadas fueron  $\alpha$ -(1-3) y/o (1-4), con grupos sulfato en la posición C2 o C4 de la fucosa y/o galactosa (Skriptsova *et al.*, 2010; Vishchuk *et al.*, 2011). Estas características, composición y posición de los sulfatos, parecen determinar la bioactividad del polisacárido; estudios *in vitro* han evidenciado que los polisacáridos sulfatados de *U. pinnatifida* presentan actividad antitumoral (Vishchuk *et al.*, 2011) y que existe una correlación positiva entre la cantidad de grupos sulfato y la actividad antioxidante (Hu *et al.*, 2010). Sin embargo, ensayos *in vivo* serían necesarios para establecer los beneficios de la inclusión de extractos de estos azúcares.

*Undaria pinnatifida* es un alga parda (Phaeophyceae) nativa del noreste de Asia (Akiyama y Kurogi, 1982) conocida como “wakame”; debido a su valor nutricional es muy utilizada en la sopa de miso, ensaladas y sushi. La tasa de cosecha en ciertas regiones, principalmente en la costa del Mar Oriental de China, eventualmente superó la tasa de crecimiento natural, por lo que el cultivo en soga de esta especie se introdujo en 1955 (Tseng, 1981). *U. pinnatifida* mostró ser una macroalga con gran capacidad para crecer y colonizar todo tipo de sustratos, naturales y artificiales, desde arrecifes rocosos y lodosos hasta botellas de plástico y cuerdas. Puede tolerar un amplio rango de intensidad lumínica, pero enfrenta dificultades para crecer en áreas con gran aporte de agua dulce (Verlaque, 2007). Estas características le han facilitado la colonización de nuevos horizontes geográficos, así es que invadió, con mucho éxito, diversas áreas en todo el mundo como son las costas mediterráneas de Francia e Italia, la costa atlántica de Europa, Australia, Estados Unidos, Nueva Zelanda y Argentina (Silva, Woodfield *et al.*, 2002; Uwai *et al.*, 2006). En Argentina, esta especie fue detectada por primera vez en 1992 en el Golfo Nuevo (Patagonia norte), donde su ingreso fue atribuido al transporte por medio del agua de lastre de buques

internacionales (Piriz y Casas, 1994, Casas y Piriz, 1996). Más recientemente, en la primavera de 2005, fue registrada en el interior de la Ría Deseado (Santa Cruz, Patagonia austral) (Martin y Cuevas, 2006), en 2007 fue reportada en el Golfo San José (Casas y Schwindt, 2008) y en el 2011 en las costas de Mar del Plata (Meretta *et al.*, 2012), ampliándose notablemente su límite de distribución austral.

Si bien *U. pinnatifida* parece ser un interesante ítem alimenticio, es necesario evaluar su potencial como aditivo, ya que para que un alimento pueda ser asimilado y aprovechado por el organismo que lo ingiere, no basta que la proteína u otro elemento se encuentre en altos porcentajes, sino que éstos deben ser digeribles (Brown *et al.*, 1989; Akiyama, Warren *et al.*, 1993). La digestibilidad *in vivo* es un parámetro que puede ayudar a estudiar el valor nutricional de los distintos insumos destinados a alimentación acuícola. Hay dos métodos posibles: el método de recolección total consistente en la recolección cuantitativa de las heces emitidas que corresponden a uno o muchos alimentos, y el método con indicador que ha sido desarrollado para obviar los problemas de la recolección cuantitativa usando un marcador inerte indigerible; el marcador más frecuentemente usado es el óxido crómico que es incorporado al alimento y luego analizado en él y en las heces (Fenucci, Müller *et al.*, 1981).

El uso de extractos de algas como alimento funcional de camarón puede ser beneficioso debido a su actividad antioxidante, que es similar al  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E). Su propiedad antioxidante se atribuye a la presencia de compuestos polares que impiden la absorción de oxígeno por el sustrato, inhibiendo la formación de peróxidos y/o actuando como donante de electrones o átomos de hidrógeno. La producción excesiva y/o la exposición de un organismo a los radicales libres (RL) y las especies reactivas de oxígeno (ROS) ocasionan daño celular (Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2004). Recientemente, los experimentos *in vitro*, han demostrado que los polisacáridos presentes en las algas juegan un rol importante como captadores de RL para la prevención del daño oxidativo en organismos vivos. La acción antioxidante *in vitro* se utiliza como una primera herramienta para seleccionar compuestos potencialmente protectores contra la oxidación de lípidos y la formulación de alimentos funcionales (Balboa *et al.*, 2013). El 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) es un RL estable usado

ampliamente para evaluar los antioxidantes naturales (algas o productos de algas) (Kang *et al.*, 2003; Kuda *et al.*, 2007) debido a su estabilidad, sencillez y reproducibilidad.

El balance entre la generación y eliminación de los ROS de los animales en cultivo intensivo puede verse afectada debido a la acumulación de compuestos nitrogenados como el amonio (Hegazi *et al.*, 2010) y/o el nitrito (Liao *et al.*, 2012). Sin embargo, los animales son capaces de contrarrestar los efectos de este estrés ambiental gracias a que cuentan con un sistema de defensas antioxidantes compuesto por enzimas antioxidantes como la catalasa (CAT) y la superóxido dismutasa (SOD) (Wang, Wang, Zhang *et al.*, 2004; Hargreaves, 1998; Li, Chen *et al.*, 2008).

Las dos especies autóctonas de peneidos de interés comercial, el camarón *Artemesia longinaris* y el langostino *Pleoticus muelleri*, están siendo sometidas a experiencias de acuicultura tanto en aguas de la Provincia de Buenos Aires como en la región patagónica y se han llevado a cabo numerosos estudios sobre nutrición (Díaz y Fenucci, 2002; Díaz y Fenucci, 2002; Fenucci, Díaz y Fernández-Gimenez, 2009). Sin embargo, hasta el momento no se ha evaluado el uso de extractos polisacáridos provenientes de macroalgas.

## 4.2. Objetivo

El objetivo principal de este capítulo fue evaluar la incorporación del extracto soluble de polisacáridos obtenido del alga parda *Undaria pinnatifida* como aditivo funcional, en la dieta del camarón *Artemesia longinaris*.

Como primer paso se realizó el análisis químico del extracto soluble. Con tal propósito se plantearon los siguientes objetivos particulares:

- Analizar la composición química del extracto soluble de polisacáridos extraído del alga parda *Undaria pinnatifida*, identificando los principales grupos funcionales de los polisacáridos presentes y la composición en monosacáridos.
- Determinar la actividad antioxidante total (AT) del extracto por espectroscopía de resonancia electrónica de espín paramagnética (EPR).

Luego se evaluó su utilización como componente dietario en el camarón *Artemesia longinaris*. Los objetivos específicos fueron:

- Establecer los efectos de la inclusión de diferentes niveles del extracto soluble sobre la digestibilidad aparente de las proteínas en ambas especies.
- Evaluar la adición del extracto sobre el estado general, crecimiento y ganancia en peso; y sobre la concentración de las variables metabólicas y la AT.

Finalmente, se estudiaron los efectos de las dietas adicionadas con el extracto de polisacáridos de *U. pinnatifida* sobre la toxicidad del nitrito. Para ello se plantearon los siguientes objetivos particulares:

- Determinar la  $LC_{50}$  al nitrito.
- Medir la actividad de la enzima antioxidante superóxido dismutasa.

### 4.3. Análisis químico del extracto

#### 4.3.1. Materiales y Métodos

##### 4.3.1.1. Obtención de extracto soluble de polisacáridos a partir de la harina de *Undaria pinnatifida*

El alga parda *Undaria pinnatifida* fue colectada en Gaiman, provincia de Chubut por la empresa Soriano S.A. Se utilizaron las algas secas molidas en un fino polvo libre de material defectuoso. Diez gramos de alga seca y molida se trataron con 300 ml de agua desionizada a temperatura de 100°C durante 3 horas con reflujo constante. El sistema se enfrió y filtro con un embudo de vidrio sinterizado de 15µm. La evaporación del filtrado se realizó en rota vapores Büchi 10566 y Heidolph W1 a presión reducida con temperatura del baño de agua inferiores a 45°C. Posteriormente el extracto se liofilizo y se conservó a -20°C hasta su utilización.

#### 4.3.1.2. Análisis del extracto por espectroscopia IR

La espectroscopia FTIR aporta datos para investigar la identidad y composición de una muestra ya que es de gran ayuda para conocer los enlaces químicos de las moléculas dando información general de la misma. Se prepararon pastillas de KBr con el extracto de los polisacáridos. Las mediciones se realizaron en un equipo Perkin Elmer Spectrum BX (FTIR), se exploró la zona entre 4000 y 400  $\text{cm}^{-1}$ . El equipo cuenta con un software V 5.3.1. para el análisis de los datos y tiene una resolución de 2  $\text{cm}^{-1}$ .

#### 4.3.1.3. Determinación de azúcares componentes

Se analizaron por cromatografía gaseosa los derivados correspondientes de las muestras hidrolizadas. Las muestras se midieron en un cromatógrafo Hewlett Packard 5690 A equipado con un detector de ionización de llama (FID) y un integrador HP 3395. Se usó nitrógeno como gas portador y las corridas se efectuaron con una relación de split 90:1. Se utilizó una columna capilar SP 2330 (Superlco), de 30m de largo, 0,25 mm de diámetro interno y 0,20 m de espesor de la fase líquida. El flujo del gas portador fue de 1ml/min y la presión en cabeza de columna fue de 15 Psi. Se realizó una corrida isotérmica a 230°C y las temperaturas del inyector y detector fueron de 240°C. Los espectros de masa (EM) se efectuaron en un equipo Shimadzu GC/MS-QP 5050 A, a un potencial de ionización de 70 eV. Las condiciones de corrida fueron idénticas a las descritas para CGL, utilizando He como gas carrier con una relación de split 60:1. El Inositol se usó como estándar interno.

**Hidrólisis ácida:** se colocaron en viales provistos de cierre de teflón 1 a 3 mg de muestra, luego se adicionó 1 ml de TFA ( $\text{CF}_3\text{COOH}$ ) 2 M, y se hidrolizaron en la estufa a 120°C durante 90 min. Después el hidrolizado se llevó a sequedad bajo corriente de aire o bien a presión reducida. Posteriormente los hidrolizados fueron disueltos en agua y nuevamente evaporados; este tratamiento se realizó las veces necesarias hasta eliminar totalmente el ácido. Las muestras fueron colocadas en un



dsecador al vacío durante una noche. Las hidrólisis fueron realizadas por triplicado.

**Preparación de los alditos peracetilados:** a las muestras secas (provenientes de la hidrólisis ácida) contenidas en los viales, se acetilaron con 1 ml de anhídrido acético-piridina (1:1), calentando durante 45 min. a 100°C. Finalmente los residuos se disolvieron en cloroformo para ser inyectados en el cromatógrafo.

**Contenido de Fucoïdan:** se determinaron los factores de respuesta relativos al inositol para los monosacáridos fucosa y galactosa, tras efectuar tres corridas en el cromatógrafo gaseoso para el extracto acuoso. Los factores se obtuvieron de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$RF - Fucosa = \frac{(\text{Peso de fucosa} / \text{Peso de inositol})}{(\text{Area de fucosa} / \text{Area de inositol})}$$

De manera análoga se calculó el factor de respuesta correspondiente a la galactosa. Los valores obtenidos fueron utilizados para calcular los porcentajes de fucosa y galactosa presente en las muestras.

A partir de los cromatograma de la muestra y los factores de respuesta calculados previamente, se determinó el contenido de fucosa según la siguiente fórmula:

$$\%Fucosa = \frac{(\text{Area fucosa} \times \text{Peso de inositol} \times RF - Fucosa)}{(\text{Area de inositol} \times \text{Peso de muestra})} \times 100$$

De manera análoga se determinó el contenido de galactosa.

El contenido de fucosa + galactosa se utilizó para estimar los fucoïdanos del extracto de Undaria en base al factor 2 utilizado muchas veces para estimar el contenido de dichos polisacáridos

**Determinación del contenido de Monosacáridos:** los monosacáridos diferentes de fucosa y galactosa se identificaron y cuantificaron por CGL y espectroscopia de masa (EM) en las mismas condiciones indicadas en el párrafo (1).

**Determinación de ácidos urónicos:** se realizó siguiendo el método de Filisetti-Cozzi y Carpita sobre el extracto acuoso de *Undaria*, pero se encontró que era poco soluble y las mediciones proyectaron valores bajos. Cuando se hizo el procedimiento de Ahmed y Labavitch (1977), solubilizando el extracto con ácido sulfúrico, se obtuvo el valor “verdadero” de la medición.

#### 4.3.1.4. Determinación de la Capacidad Antioxidante Total

La existencia de un pool de radicales en el extracto estará representado por radicales persistentes seguramente originados a partir de las sustancias protectoras. Cuando se agrega una solución del radical DPPH al extracto es consumido a una velocidad que depende de la cantidad de sustancias protectoras presentes.

Las muestras se liofilizaron y se cuantificaron los radicales libres del extracto acuoso mediante espectroscopia de resonancia paramagnética de spin (EPR) siguiendo la metodología de Díaz, Fernández-Gimenez *et al.* (2004). Se utilizó un radical libre estable DPPH, que presenta una señal distintiva en el EPR.

Las muestras se midieron en un equipo Eleksys E 500 T Spectrometer, operando a X-band. Se pesaron 0,02 g de extracto y se homogeneizaron con 1 ml de cloroformo. Se colocaron 50 µl de la dilución del extracto con 50 µl de solución de DPPH ( $2.8 \times 10^{-5}$ M) en un tubo de cuarzo de 4 mm de diámetro, en atmósfera de argón a 20°C. Se mezclaron y se midió a intervalos fijos de tiempo durante 30 minutos.

La amplitud de la señal fue transformada en la concentración del radical por comparación del área del espectro de absorción de la muestra con el de una solución estándar de DPPH en cloroformo. Todos los espectros se registraron utilizando los siguientes parámetros: potencia de microonda, 12,93 mW; frecuencia, 9,71 GHz; frecuencia de modulación, 100 kHz; atenuación, 12 dB; amplitud de modulación, 100mT; campo centrado, 346.5 mT; ancho de barrido, 10mT; tiempo de barrido, 60s para tres escaneos (Díaz, Velurtas *et al.*, 2013).

Las medidas se repitieron al menos tres veces para minimizar los errores aleatorios. Se utilizó el programa Origin Pro para realizar el ajuste de los puntos siempre que fue necesario. Análisis estadístico

Los datos se expresaron como la media  $\pm$  desviación estándar. Se utilizó el test de ANOVA entre los tratamientos y las réplicas. En todos los casos, las diferencias se consideraron significativas cuando  $P < 0,05$  (Sokal y Rohlf, 1995).

#### 4.3.2. Resultados

El análisis IR nos permitió identificar las bandas características de los componentes del extracto soluble en agua (Fig. 4.2). La señal en la zona de  $3400\text{--}3200\text{ cm}^{-1}$  corresponde a la absorción del O-H de un alcohol. La banda a  $1740\text{ cm}^{-1}$  fue asignada a C=O del grupo O-acetil. La absorción a  $1638\text{ cm}^{-1}$  y  $1420\text{ cm}^{-1}$  pertenecen a la vibración derivada del estiramiento asimétrico y simétrico del anión carboxilato. La absorción a  $1457\text{ cm}^{-1}$  se atribuyó a la vibración de tijereteo del  $\text{CH}_2$  (galactosa y xilosa) y a la vibración de flexión asimétrica de  $\text{CH}_3$  (fucosa y grupo O-acetil). La región del espectro IR de  $1380\text{--}1376\text{ cm}^{-1}$  fue asignada a la vibración de flexión simétrica del grupo metilo y exhibe un ensanchamiento alrededor de  $1260\text{--}1220\text{ cm}^{-1}$  adjudicado a la presencia del grupo (S=O) del éster sulfato el cual es un componente característico del fucoideano de las algas pardas. Las bandas en la región  $900\text{--}840\text{ cm}^{-1}$  se asignan a la presencia de galactosa sulfatada y no sulfatada, de las cuales se destacan la banda del enlace tipo-beta (S=O) a  $890,04$  y la banda a  $844,39$  del grupo sulfato en posición C-4 axial, propias del fucoideano. El IR característico a  $625$  y  $580\text{ cm}^{-1}$  se atribuyó a la deformación asimétrica y simétrica O=S=O de sulfatos. La localización a  $960\text{ cm}^{-1}$  se relacionó con la vibración de flexión de C-O con contribución de la flexión C-C y la vibración de deformación de los residuos de ácidos urónicos en las unidades heteropoliméricas.

TABLA 4.1: Composición en monosacáridos (g 100 g<sup>-1</sup> de muestra) del extracto soluble obtenido de *Undaria pinnatifida* luego de la hidrólisis.

(a) Por el método utilizado, la manosa no se puede distinguir del manitol libre. tr.: trazas, < 0,1 %

	Ramnosa(%)	Fucosa(%)	Arabinosa(%)	Xilosa(%)	Manosa <sup>a</sup> (%)	Galactosa(%)	Glucosa(%)
<i>U. pinnatifida</i> tr.		4.4	0.2	0.2	14.5	4.3	0.5

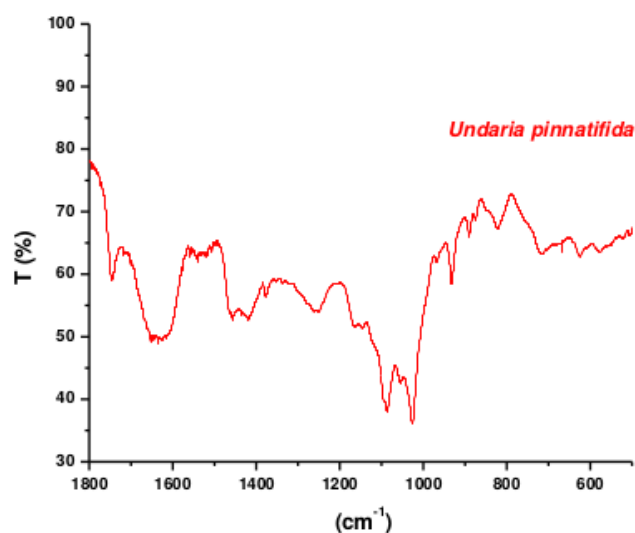


FIGURA 4.2: Espectro FTIR del extracto de polisacáridos obtenido a partir de la harina del alga parda *U. pinnatifida*.

La composición de monosacáridos de *U. pinnatifida* del extracto soluble en agua determinados por CGL-MS se muestran en la Tabla 4.1. Los resultados revelan que los componentes principales de la muestra fueron el manitol y el fucoidan. El principal alditol determinado en el hidrolizado fue el manitol, que puede ser originado por la reducción de manosa durante la hidrólisis o existir como manitol originalmente en la muestra, esta última opción parece ser la más posible. Los monosacáridos que sigue en abundancia son la fucosa y la galactosa. También se detectaron en menor cantidad ramnosa, glucosa, xilosa y arabinosa. El contenido de fucosa + galactosa fue de 8,7%, este valor corresponde a 17,4 % de fucoidanos, siendo su relación fucosa/galactosa igual a 1.

En la figura 4.3 se muestra la cinética de la reacción del extracto de polisacáridos con el DPPH donde se observa la actividad secuestrante del extracto. La concentración del radical disminuyó al incrementar el tiempo de reacción, hasta alcanzar un 50 % de DPPH a los 18 minutos y luego permaneció constante.

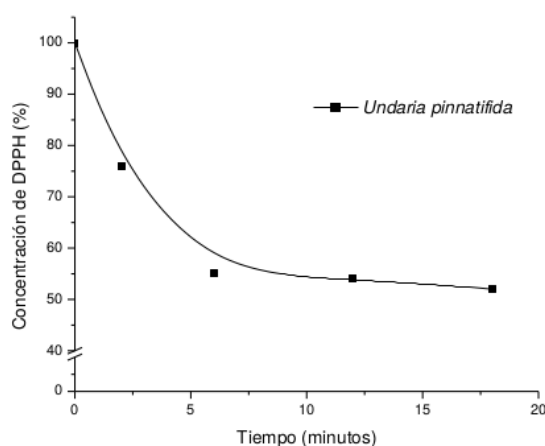


FIGURA 4.3: Porcentaje del radical DPPH remanente en función del tiempo para el extracto de polisacáridos de *U. pinnatifida*.

## 4.4. Evaluación de la inclusión del extracto como componente dietario

### 4.4.1. Materiales y Métodos

#### 4.4.1.1. Obtención de los animales en experimentación

Los ejemplares de *Artemesia longinaris* utilizados para la experimentación fueron capturados en la zona costera frente a Mar del Plata, entre Punta Cantera y Cabo Corrientes ( $38^{\circ}$  S,  $57^{\circ}$  33' O), mediante una lancha de pesca costera. La pesca se realizó con una red de arrastre a una profundidad de entre 3 y 8 brazas, con lances de no más de diez minutos, para evitar la muerte o el deterioro de los animales. En la lancha se seleccionaron los camarones y se colocaron en recipientes de PVC de 89 l con agua de mar hasta la llegada a puerto. En la Estación Nágera se mantuvieron durante una semana en tanques de 10000 l de capacidad para su aclimatación a las condiciones de laboratorio.

Con respecto a las condiciones ambientales, la temperatura fue de  $20 \pm 0.8^{\circ}\text{C}$  el fotoperiodo fue de 12:12 hs (L:O), el pH 7 y la salinidad de 33.

TABLA 4.2: Ingredientes que componen las dietas.

Ingredientes (g 100 g <sup>-1</sup> )	C	U1	U2	U3
Harina de pescado (65 % proteínas cruda) <sup>a</sup>	48	48	48	48
Harina de soja (42 % proteína cruda) <sup>b</sup>	17	17	17	17
Almidón	20	20	20	20
Proteínas de calamar (85 % proteína cruda)	1	1	1	1
Salvado de trigo	8,5	7,5	6,5	6,5
Extracto de <i>U. pinnatifida</i>	0	1	2	3
Aceite de pescado	2	2	2	2
Soluble de pescado	2	2	2	2
Lecitina de soja	0,5	0,5	0,5	0,5
Colesterol	0,5	0,5	0,5	0,5
Suplemento vitamínico	0,5	0,5	0,5	0,5
Composición proximal (% materia seca)				
Humedad	5,5	5,5	5,5	5,5
Proteína cruda	41	41	41	41
Lípidos totales	11,8	11,8	11,8	11,8
Cenizas	9,4	9,4	9,4	9,4

(a) Agustini S.A. Mar del Plata, Argentina; (b) Melrico S.A. Argentina; c g kg<sup>-1</sup>: colecalciferol 1,8; tiamina 8,2; riboflavina 7,8; piridoxina 10,7; pantotenato de calcio 12,5; biotina 12,5; niacina 25,0; ácido fólico 1,3; B12 HCl 1,0; ácido ascórbico (Rovimix Stay C) 39,1; menadiona 1,7; inositol 0,3; colina clorada 0,2;  $\alpha$ -tocoferol acetato 75; vitamina A acetato 5,0.

#### 4.4.1.2. Experimento de alimentación

Los ejemplares se alimentaron *ad libitum* una vez al día con dietas pelletizadas (Tabla 4.2) preparadas en el laboratorio por el método de extrusión en frío (Díaz y Fenucci, 2002). Se utilizaron cuatro dietas suplementadas con 0 % (Control), 1 % (U1), 2 % (U2) y 3 % (U3) de extracto de *Undaria pinnatifida*. Las dietas se formularon de acuerdo con la composición química de sus ingredientes como isoproteícas e isolipídicas. La composición proximal de las dietas se determinó de acuerdo con Horwitz (2003).

La tasa de alimentación se ajustó diariamente en cada tanque con el objeto de minimizar los desechos. Las dietas se testearon por cuadruplicado durante 30 días. Los animales se pesaron al inicio y al final del experimento.

Al finalizar el experimento los animales se anestesiaron en hielo y mediante disección, se extrajeron los hepatopáncreas que fueron congelados y liofilizados para el análisis de EPR. El crecimiento y la supervivencia se expresaron como porcentaje en peso ganado  $[(\text{peso medio final} - \text{peso medio inicial}) / \text{peso medio inicial}] \times 100$  y porcentaje de supervivencia.

#### 4.4.1.3. Determinación de las de variables metabólicas

Para la determinación de las variables metabólicas se extrajeron entre 200 y 300 µl de hemolinfa que se colocaron en una solución anticoagulante de citrato de sodio al 10 %. Se realizaron 3 réplicas de cada tratamiento. Las muestras se centrifugaron a 10.000g durante 15 minutos a -4°C, los sobrenadantes se utilizaron para las determinaciones bioquímicas, a partir de kits comerciales de BioSystems.

Las especificaciones sobre las técnicas empleadas para cada metabolito (glucosa, proteínas totales, colesterol, triglicéridos) están descriptas en el ítem 2.3.1.3.

#### 4.4.1.4. Digestibilidad aparente

El experimento de digestibilidad se realizó por un lapso de 3 semanas. Las primeras dos semanas correspondieron al período de adaptación a la dieta, durante el cual se alimentó a los camarones con las mismas dietas utilizadas en el experimento de alimentación (Control, U1; U2 y U3) con el agregado de 0,25 % de óxido de cromo como marcador inerte. Durante la tercer semana, para determinar la digestibilidad de las proteínas crudas, antes de cada alimentación, las heces fueron colectadas y lavadas con agua destilada con el fin de eliminar el exceso de sales; luego fueron almacenadas a -20°C.

Al finalizar el experimento, se determinó la composición proximal de las dietas y las heces por los métodos descritos por Horwitz (2003). Los niveles de óxido de cromo se midieron con un espectrofotómetro UV visible Shimadzu UV-2102 PC. Los coeficientes de digestibilidad aparente (CDA) fueron estimados de acuerdo a Fenucci, Zein-Eldin *et al.* (1980):

$$CDA = 100 - 100 \times \frac{Cr_2O_3 \text{ dieta} \times \% \text{ proteínas en heces}}{Cr_2O_3 \text{ heces} \times \% \text{ proteínas en dieta}}$$

#### 4.4.1.5. Actividad antioxidante total

Para la determinación la actividad antioxidante total (AT), las hepatopáncreas de cada tratamiento y el control se liofilizaron y conservaron a -20°C. Posteriormente, 25

mg de tejido liofilizado de cada muestra fueron mezclados con 1ml de cloroformo bajo atmósfera de argón. Cada mezcla de reacción contenía 50  $\mu$ l de muestra y 50  $\mu$ l de DPPH ( $2,8 \times 10^{-5}$  M). Se preparó un control o blanco reemplazando el volumen de solución del tejido por cloroformo y se observó que el espectro en EPR de dicha solución permanece inalterable durante el tiempo empleado en las mediciones. Las muestras se colocaron en tubos de cuarzo de 4 mm de diámetro interno para conseguir una afinación adecuada en el equipo, se trabajó en atmósfera de argón y a una temperatura constante de 293K. El análisis en el equipo se realizó a intervalos de 30 minutos.

#### 4.4.1.6. Análisis estadísticos

Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  error estándar y se analizaron mediante análisis de varianza (ANOVA). Los resultados de supervivencia se analizaron mediante test de  $\chi^2$ . Para comparar y determinar el grado de significancia de los resultados del experimento de digestibilidad se aplicó la transformación arcoseno en los porcentajes de digestibilidad de proteínas y se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA). En todos los casos la significación fue  $P < 0,05$  (Sokal y Rohlf, 1995).

#### 4.4.2. Resultados

En la Tabla 4.3 se presentan los datos de peso ganado y supervivencia de los camarones alimentados con las distintas dietas. Luego de 30 días de experimentación los porcentajes de incremento en peso medio variaron entre 9,2 y 16,7 %, con diferencias significativas entre los animales alimentados con las dietas adicionadas con el extracto de *U. pinnatifida* (U1; U2 y U3) y el control. Con respecto a la supervivencia no se registraron diferencias significativas, con valores entre 60 y 90,24 %.



TABLA 4.3: Peso promedio inicial, ganancia en peso y tasa de supervivencia de *A. longinaris* alimentados con dietas que contienen extractos de polisacáridos a diferentes concentraciones durante 30 días.

PMI: peso medio inicial; PMF: peso medio final; PIP: porcentaje de incremento de peso; S: supervivencia. Medios en una fila con diferentes letras superíndice se diferencian significativamente ( $P < 0,05$ ).

	C (dieta control)	Dietas adicionadas con <i>U. pinnatifida</i>		
		U1	U2	U3
(r)1-2 PMI (g)	3,78 ± 0,67	3,76 ± 0,73	3,46 ± 0,48	3,61 ± 0,5
PMF (g)	4,13 ± 0,17	4,31 ± 0,26	4,04 ± 0,74	4,01 ± 0,63
PIP (%)	9,26 <sup>a</sup>	14,63 <sup>b</sup>	16,76 <sup>b</sup>	11,08 <sup>a</sup>
S (%)	60 <sup>c</sup>	60 <sup>c</sup>	73,3 <sup>c</sup>	90,24 <sup>d</sup>

El estudio de las variables hemolinfáticas determinó que no existe correlación entre la concentración de los metabolitos analizados y la concentración de aditivo dietario. En la Figura 4.4, se puede observar que la U1 provoca el incremento de los niveles de todos los metabolitos en *A. longinaris*, si bien la cuantificación sólo determinó diferencias significativas en la concentración de las proteínas y del colesterol.

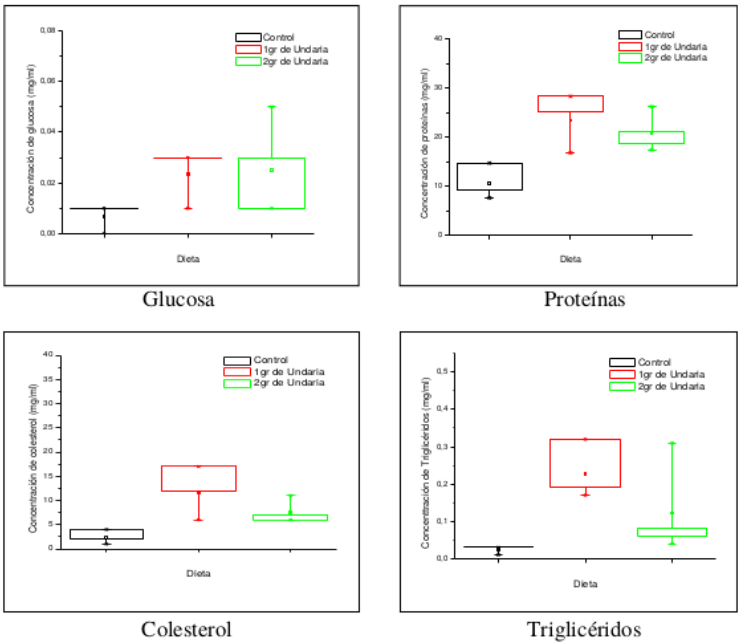


FIGURA 4.4: Concentración de metabolitos en hemolinfa de *A. longinaris* alimentados con diferentes dietas.

En la Tabla 4.4 se detallan los coeficientes de digestibilidad aparente de proteínas

TABLA 4.4: Coeficientes de digestibilidad aparente de proteínas para *A. longinaris*

Valores medios  $\pm$  desviación estándar. Porcentajes con diferentes supraíndice muestran diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).

Tratamiento	% de eficiencia
Control	80,61 $\pm$ 3,14 <sup>a</sup>
U1	81,53 $\pm$ 0,81 <sup>a</sup>
U2	77,30 $\pm$ 1,54 <sup>b</sup>
U3	74,02 $\pm$ 4,22 <sup>b</sup>

para *A. longinaris* alimentados con las diferentes dietas. Se observaron diferencias significativas en los coeficientes de digestibilidad aparente de proteínas. La incorporación de extracto de polisacáridos del alga parda *U. pinnatifida* disminuyó la digestibilidad de la dieta suplementada con 2 y 3 gramos de extracto respecto de las dietas U1 y control; lo cual indica que la incorporación de este extracto interfiere en la absorción de las proteínas.

Las reacciones cinéticas del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) con los homogenatos de hepatopáncreas de *A. longinaris* alimentados con dieta control; U1; U2 y U3 de extracto de *U. pinnatifida* se muestran en la Figura 4.5. Todos los tratamientos mostraron capacidad protectora antioxidante evidenciada por la capacidad de reaccionar con el DPPH.

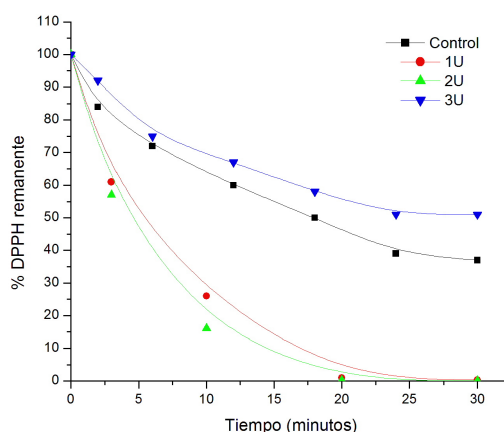


FIGURA 4.5: Cinética de reacción de los homogenatos de hepatopáncreas de camarones alimentados con dietas adicionada con el extracto soluble de polisacáridos del alga parda *Undaria pinnatifida* con el radical DPPH. Todas las mediciones se realizaron por triplicado y los valores medios fueron los ploteados.

En los homogenatos de los camarones alimentados con U1 y U2 se observó un rápido

decaimiento del radical DPPH en los primeros 2 minutos de reacción; el radical fue efectivamente consumido en alrededor de 30 minutos. En el caso de los alimentados con U3 el decaimiento fue similar al control, con un 51 y 37 % de DPPH remanente que permaneció sin reaccionar.

## **4.5. Toxicidad del nitrito en animales alimentados con dietas adicionadas con extracto**

### **4.5.1. Materiales y métodos**

#### **4.5.1.1. Determinación de la $LC_{50}$ (concentración letal media)**

La metodología empleada para la obtención de los animales y su posterior aclimatación se describen en el ítem 4.2. Los camarones fueron alimentados durante 4 semanas con una dieta control y dos dietas suplementadas con 2 y 3g de extracto de *U. pinnatifida*/100g de dieta (la composición de ambas dietas está dada en la Tabla 4.2). Posteriormente, se realizó un ensayo estático de toxicidad aguda (Finey, 1971) en el que los camarones fueron expuestos durante 96 horas a concentraciones crecientes de nitrito (0; 50; 100; 150; 200; 250; 300; 400 y 500 mg/l).

#### **4.5.1.2. Determinación de las variables metabólicas**

La metodología empleada se describe en el ítem 2.3.1.3.

#### **4.5.1.3. Actividad de enzimas antioxidantes**

Una parte de los individuos restantes fueron utilizados para la determinación de la actividad enzimática de la enzima antioxidante superóxido dismutasa. Fueron colocados en nitrógeno líquido y mantenidos a -80°C, con el fin de frenar la actividad enzimática.

Los hepatopáncreas de los camarones fueron homogeneizados en nueve volúmenes de 20mM buffer fosfato pH 7,4; 1mM EDTA y 0,1 % Triton X-100. Los homogenatos

se centrifugaron a 10000g por 15 minutos, los sobrenadantes se utilizaron para los análisis enzimáticos.

**Superóxido dismutasa (SOD):** La determinación de la actividad de SOD se realizó siguiendo el método basado en la medida de la tasa de inhibición, por parte de la SOD, de la reacción de los radicales superóxidos, formados a partir de la xantina por la xantina oxidasa (XOD), con el cloruro de 2-(-4-yodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-fenil tetrazolio (INT) para formar el colorante formazán. La cinética de la reacción se siguió midiendo la absorbancia a 505nm en un espectofotómetro Shimadzu UV-120-01. Se ploteó el porcentaje de inhibición para cada estándar versus Log10 (concentración del estándar en unidades SOD/ml). Una unidad SOD se define como la cantidad de proteína que causa el 50 % de inhibición de la reducción del INT. El porcentaje de inhibición de la muestra se utilizó para obtener las unidades de SOD a partir de la curva estándar (Biaiginini1995).

#### 4.5.1.4. Análisis estadísticos

Para comparar y determinar el grado de significación de los resultados obtenidos en los ensayos metabolitos y de actividad enzimática de superóxido dismutasa, se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA). Para la obtención de la  $LC_{50}$  se llevó a cabo un análisis Probit, el nivel de significancia se determinó mediante el test de  $\chi^2$ . La significancia en todos los casos fue  $P < 0,05$  (Sokal y Rohlf, 1995).

#### 4.5.2. Resultados

Al cabo de las 96 hs de experimentación, la concentración letal media ( $LC_{50}$ ) al nitrito determinada para los camarones alimentados con dieta control fue de 650,84 mg/l, y para aquellos alimentados con 2 y 3 gramos de extracto de *U. pinnatifida* fue de 725,24 y 493,57 mg/l, respectivamente.

La actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD) para los camarones alimentados con diferentes dietas y expuestos a nitrito, se muestra en la figura 4.6. La adición del extracto de polisacáridos de *U. pinnatifida* en la dieta, mejoró la respuesta

antioxidante en *A. longinaris*. En los homogenatos de los camarones expuestos a 200 mg/l de nitrito y alimentados con las dietas U2 y U3, la actividad de SOD fue significativamente mayor respecto de la dieta control, pero en concentraciones superiores e inferiores de nitrito, no se determinó diferencias significativas entre los tratamientos.

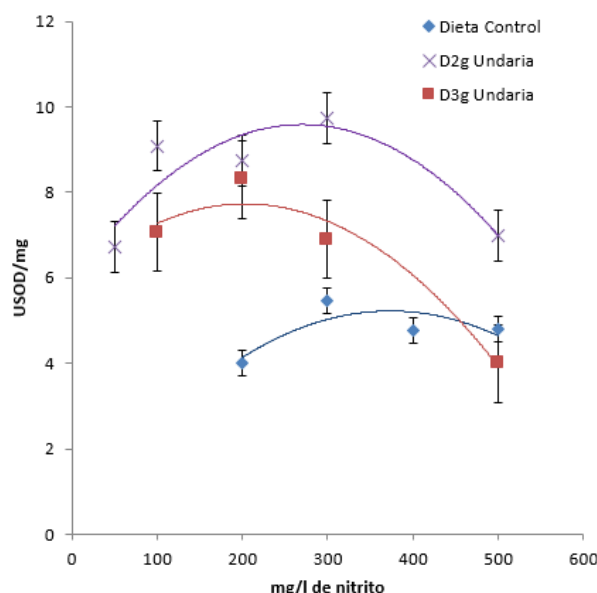


FIGURA 4.6: Actividad de superóxido dismutasa en homogenatos de *A. longinaris* expuestos a concentraciones crecientes de nitrito y alimentados con dieta control y dietas con 2 y 3 gramos de extracto de polisacáridos del alga parda *U. pinnatifida*  
 Dieta control ( $y = -4 \times 10^{-5}x^2 + 0,0269x + 0,2$ ;  $R^2 = 0,6284$ ), D2g Undaria ( $y = -5 \times 10^{-5}x^2 + 0,0265x + 6,0097$ ;  $R^2 = 0,7858$ ) y D3g Undaria ( $y = -4 \times 10^{-5}x^2 + 0,0175x + 5,9525$ ;  $R^2 = 0,9441$ ).

## 4.6. Discusión

En los últimos años se ha trabajado mucho sobre la obtención de extractos ricos en compuestos bioactivos provenientes de las algas marinas. Los mismos se han preparado utilizando métodos enzimáticos (Je *et al.*, 2009) y ácidos (Ponce *et al.*, 2003) con el fin de obtener estos compuestos lo más purificados posible. Sin embargo, estos compuestos son sensibles a las técnicas de extracción basadas en el uso de calor o disolventes. Además, estas técnicas consumen mucho tiempo y requieren mucha energía. Por lo tanto, es necesario identificar y desarrollar nuevos procesos eficientes de extracción para la obtención de los bioactivos presentes en las algas marinas, técnicas que no sólo disminuyan los costos y tiempo sino que además sean respetuosos con el medioambiente (Kadam *et al.*, 2013). En el presente estudio, se

preparó un extracto soluble en agua con el fin de obtener la fracción de polisacáridos bioactivos presentes en esta alga.

Como la extracción de polisacáridos con ácido o agua como disolvente puede no ser selectiva, obteniendo mezclas complejas de los principales compuestos presentes en las macroalgas pardas (Kadam *et al.*, 2013); se procedió a realizar algunos análisis químicos que pueden ayudar a conocer mejor cuál es la composición del extracto obtenido por el método de extracción realizado. En primer lugar, se realizó un análisis del espectro FTIR, el cual ha permitido obtener una aproximación sobre composición general del extracto soluble, a través de la identificación grupos funcionales característicos de los principales polisacáridos asociados a las paredes celulares y a los espacios extracelulares de *U. pinnatifida*, como son los alginatos y fucooidanos.

El análisis CGL-MS determinó que los principales componentes químicos de la muestra eran manitol y fucoidán. Los datos obtenidos mostraron que el extracto tiene una relación fucosa/galactosa de 1, el mismo está asociado al contenido de fucoidano, y ese valor es similar a los reportados en estudios previos de la misma alga (Synytsya *et al.*, 2010; Hemmingson *et al.*, 2006). Por otra parte, el ácido urónico presente puede formar parte de las moléculas de fucoidano (Usov y Bilan, 2009) o puede ser de alginato coextraído.

DPPH es un radical libre estable y acepta un radical de electrones o hidrógeno para convertirse en una molécula diamagnética estable. Por lo tanto, DPPH se utiliza a menudo como un sustrato para evaluar la actividad antioxidante de una muestra (Binsan *et al.*, 2008; Je *et al.*, 2009; Hu *et al.*, 2010). El análisis de EPR determinó que los polisacáridos presentes en el extracto actuaron como agentes secuestradores del radical DPPH, este resultado coincide con el informado por Hu *et al.* (2010) para el extracto crudo de polisacáridos sulfatados de la misma alga. Debido a su potencial antioxidantes, el extracto de polisacáridos obtenido del alga parda *U. pinnatifida* fue utilizado como aditivo dietario en los experimentos de alimentación realizados con el camarón *A. longinarius*.

Los compuestos de algas marinas se han utilizado como agentes gelificantes, espesantes y emulsionantes en una gran cantidad de productos alimenticios, pero no se

identificaron como una fuente de compuestos promotores de la salud. Recientes investigaciones sobre alimentos con ingredientes funcionales han demostrado que las algas marinas son una rica fuente de nutraceuticos con una variedad de actividades biológicas (Vo y Kim, 2013). En diferentes estudios se ha informado que los polisacáridos presentes en las algas o sus extractos (alginato, fucoidano y laminarina) pueden controlar las enfermedades virósicas y bacterianas (Holdt y Kraan, 2011). La extracción de polisacáridos con ácido o agua como disolvente puede no ser selectiva, obteniendo mezclas complejas de los principales compuestos presentes en las macroalgas pardas (Kadam *et al.*, 2013). En el presente estudio, preparamos extractos solubles en agua de algas marinas para utilizar la fracción bioactiva de polisacárido como ingrediente funcional para adicionar en la dieta del camarón *A. longinarius*.

En acuicultura, uno de los grandes desafíos es optimizar el alimento suministrado (Akiyama, Dominy *et al.*, 1991, Suresh, 2006). La demanda de dietas balanceadas para el cultivo del camarón tiene una tendencia creciente en el mundo, por lo que es importante encontrar nuevos ingredientes no convencionales como las algas marinas. Varios trabajos (Rivera *et al.*, 2002, Gutiérrez Leyva, 2006, Cruz-Suárez *et al.*, 2009) evaluaron el efecto de incluir harina de *Macrocystis pyrifera* en dietas para el camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, con excelentes resultados en términos de tasa de crecimiento y supervivencia. En el presente estudio, la suplementación con extractos de polisacáridos de *U. pinnatifida* mostró en todos los tratamientos una supervivencia aceptable para cultivos comerciales (superior al 60 %) (Clifford, 1994), con valores similares a los obtenidos para otras especies de camarones (Casas-Valdez *et al.*, 2006, Cruz-Suárez *et al.*, 2009). Los estudios informaron que la inclusión de algas pardas además de mejorar el crecimiento, la ingesta de alimento y la textura de la dieta, reducen la pérdida de materia seca y aumentan la absorción de agua, demostrando ser un excelente aglutinante para los alimentos peletizados (Cruz-Suárez *et al.*, 2007, Cruz-Suárez *et al.*, 2009). Además, Niu, Chena *et al.* (2015) informaron que la inclusión de la harina de *U. pinnatifida* en las dietas de *Penaeus monodon*, promueve el aumento de los valores finales de peso promedio, el aumento de peso y la tasa de crecimiento específico. Resultados similares se obtuvieron en el presente trabajo con *A. longinarius*, ya que los camarones alimentados con U1; U2 y U3 mostraron un

mayor crecimiento.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo, indican que *A. longinaris* presentó una buena digestibilidad de proteínas para todas las dietas utilizadas. El coeficiente de digestibilidad varió entre 74,02 % y 81,53 % siendo significativamente menor en los animales alimentados con las dietas U2 y U3, resultados coincidentes con trabajos en los que se observó una disminución del coeficiente de digestibilidad aparente a medida que se aumentaba el porcentaje de polisacáridos en la dieta. Borrer y Lawrence (1989) observaron que el nivel de celulosa dietética modificó el coeficiente de digestibilidad aparente de proteínas en *Farfantepenaeus aztecus*, con una reducción de los valores de digestibilidad a medida que los niveles de celulosa aumentaban. Resultado similar se observó en *Macrobrachium rosenbergii* (González-Peña *et al.*, 2002). En *A. longinaris* Velurtas *et al.* (2011) demostraron que el coeficiente de digestibilidad aparente disminuyó de 83,7 % a 51,2 % a medida que los porcentajes de almidón en la dieta aumentaban.

La actividad antioxidante total (AT) se testeó en los homogenatos de los camarones alimentados con 0 %; 1 %; 2 % y 3 % del extracto soluble de polisacáridos de *U. pinnatifida*, por espectroscopia de resonancia de electrones paramagnética. Todos los tratamientos mostraron una capacidad protectora antioxidante por su capacidad para reaccionar con el radical DPPH. El potencial de las algas marinas como ingrediente alimentario funcional es importante en los animales acuáticos, los resultados obtenidos hasta el momento indicaron que podría ser un ingrediente prometedor para mejorar el estado de salud de los animales bajo cultivo. Estudios anteriores han evaluado la suplementación de dietas para camarones con varios niveles de harinas de algas, 2-8 % de *Macrocystis pyrifera* (Cruz-Suárez *et al.*, 2009), 2-4 % de *Sargassum* spp. (Cruz-Suárez *et al.*, 2007) y 1-6 % de *U. pinnatifida* (Niu, Chena *et al.*, 2015) obteniendo excelentes resultados en términos de crecimiento. Por otra parte, se utilizan extractos de diferentes algas para mejorar la capacidad antioxidante; para aprovechar mejor este potencial, es necesario el uso de tecnologías de extracción no convencionales, que no utilizan disolventes orgánicos, aunque los extractos obtenidos no son puros. La técnica de extracción utilizada en el presente estudio es simple, no tóxica, eco-amigable, y mostró buenos resultados experimentales con respecto al análisis de la



capacidad antioxidante, debido a la alta concentración de fucoïdan encontrado en el extracto de esta alga marina.

En los animales acuáticos, una de las maneras en que el nitrito ejerce su toxicidad es a través de la generación de radicales libres; por lo tanto, la medición de la actividad antioxidante de la enzima superóxido dismutasa (SOD) en los camarones puede ser utilizada como un indicador de su presencia (Wang, Wang, Zhang *et al.*, 2004). En el caso de *A. longinarius* se determinó una actividad superior de SOD en los animales con dietas adicionadas con U2, que indica que los polisacáridos presentes en el extracto activa el sistema de defensas antioxidantes protegiendo a los camarones de la toxicidad del nitrito.

Hasta el momento no se habían realizado estudios sobre los beneficios de la incorporación de extractos algales, a la dieta de los camarones peneidos, para mejorar la resistencia al estrés producido por la presencia de nitrito en el agua de cultivo. Los resultados obtenidos en los ensayos estáticos de toxicidad aguda al nitrito demostraron un incremento en la tolerancia de *A. longinarius* ante la exposición a este tóxico cuando son alimentados con dietas adicionadas con el extracto soluble de polisacáridos obtenido de *U. pinnatifida*. Los reportes del uso de algas como aditivo alimenticio de camarones, indican que una dieta con 2 % de *U. pinnatifida* incrementa la inmunidad en *L. vannamei* (Schleder *et al.*, 2017) y en *Penaeus monodon* (Niu, Chena *et al.*, 2015); en el caso de *A. longinarius*, la dieta U2 fue la que otorgó la mayor protección ante el incremento de nitrito, obteniéndose una  $LC_{50}$  de 725,24 mg/l.



## Consideraciones finales

El langostino *Pleoticus muelleri* y el camarón *Artemesia longinaris* son las especies de crustáceos de mayor importancia comercial de la Argentina. Debido al creciente interés de la industria por su cultivo, es importante determinar la influencia que tienen factores ambientales y nutricionales sobre la toxicidad de compuestos nitrogenados comúnmente encontrados en los estanques de cultivo.

Los resultados obtenidos en el presente estudio permiten concluir que la toxicidad del nitrito sobre *P. muelleri* incrementa con el tiempo de exposición y que la presencia de concentraciones subletales de este poluyente en el medio aumenta la actividad del sistema de defensas antioxidantes. El análisis histológico confirma la sensibilidad de los tejidos branquial y hepatopancreático frente al estrés causado por el nitrito ambiental. Por lo tanto, la medición de la capacidad antioxidante total y el análisis histológico de dichos órganos pueden ser utilizados como biomarcadores de contaminación por nitrito en esta especie.

La capacidad protectora antioxidante es afectada por la disminución salinidad y la presencia de nitrito en el agua. En condiciones hiposmóticas se activan las defensas antioxidantes extracelulares de *P. muelleri*, disminuyendo los efectos estresantes del incremento de nitrito ambiental.

Se demostró que la nutrición juega un rol importante en la protección de los camarones peneidos ante la toxicidad del nitrito en condiciones de cultivo. La suplementación de la dieta de *P. muelleri* con astaxantina, aumenta la resistencia a este poluyente, actuando como antioxidante y protector de los tejidos branquial y hepatopancreático.

El uso de extractos de polisacáridos de *Undaria pinnatifida* es factible como aditivo en las dietas para el camarón *A. longinaris*. El nivel óptimo de inclusión del extracto de

*U. pinnatifida* puede variar, pero para el cultivo de esta especie, la concentración recomendada es del 2 %, ya que es la que mejoró significativamente el rendimiento del crecimiento, las defensas antioxidantes y disminuyó la toxicidad del nitrito ambiental, a través del incremento de la actividad de la enzima antioxidante superóxido dismutasa.

En base a los resultados de esta Tesis se consideran corroboradas las hipótesis planteadas sobre el aumento de la tolerancia al nitrito ante condiciones hiperosmóticas y la suplementación de las dietas con compuestos bioactivos. Estos hallazgos destacan la necesidad de controlar la salinidad del agua de cultivo y mejorar la composición de las dietas suministradas a los camarones en cautiverio. Finalmente, se puede concluir que la medición de la capacidad antioxidante total puede ser utilizada como indicador del estrés causado por la exposición al nitrito en los camarones peneidos, *Pleoticus muelleri* y *Artemesia longinaris*.

# Bibliografía

- Ahmed, A.E.R. y J.M. Labavitch (1977). «Simplified method for accurate determination of cell wall uronide content». En: *Journal of Food Biochemistry* 1, págs. 361-365.
- Akiyama, D.M., W.G. Dominy y A.L. Lawrence (1991). *Penaeid shrimp nutrition for the commercial feed industry revised*. En: *Proceedings of the aquaculture feed processing and nutrition workshop*. Ed. por D.M. Akiyama y R.K.H. Tan. Thailand e Indonesia, págs. 80-90.
- Akiyama, D.M., G. Warren, W. Dominy y A.L. Lawrence (1993). «Nutrición de camarones peneidos para la industria de alimentos comerciales». En: *Memorias del Primer Simposium Internacional de Nutrición y Tecnología de Alimentos para Acuicultura*. Ed. por L.E. Cruz-Suárez, D. Ricque-Marie y R. Mendoza-Alfaro. Monterrey, Nuevo León, México, págs. 43-80.
- Akiyama, K. y M. Kurogi (1982). «Cultivation of *Undaria pinnatifida* (Harvey) Surinagar, the decrease in crops from natural plants following crop increase from cultivation». En: *Tohoku Reg. Fish. Res. Lab. Bull.* 44, págs. 91-100.
- Alcantara, L. y T. Noro (2006). «Growth of the abalone *Haliotis diversicolor* (Reeve) fed with macroalgae in floating net cage and plastic tank». En: *Aquaculture Research* 37 (7), págs. 708-717.
- Allan, E.L., P.W. Froneman y A.N. Hodgson (2006). «Effects of temperature and salinity on the standard metabolic rate (SMR) of the caridean shrimp *Palaemon perin-gueyi*». En: *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 337, págs. 103-108.
- Ambati, Ranga Rao, Siew Moi Phang, Sarada Ravi y Ravishankar Gokare Aswatharayan (2014). «Astaxanthin: Sources, Extraction, Stability, Biological Activities and Its Commercial Applications—A Review». En: *Marine Drugs* 12, págs. 128-152. ISSN: 1660-3397. DOI: [10 . 3390 / md12010128](https://doi.org/10.3390/md12010128). URL: [http : / / www . mdpi . com / journal/marinedrugs](http://www.mdpi.com/journal/marinedrugs).
- Angelescu, V. y E.E. Boschi (1959). *Estudio biológico pesquero del langostino de Mar del Plata en conexión con la Operación Nivel Medio*. Ed. por Servicio de Hidrografía Naval. Vol. H1017.
- Armenta, R.E. e I. Guerrero-Legarreta (2009). «Stability studies on astaxanthin extracted from fermented shrimp byproducts». En: *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57, págs. 6095-6100.
- Bagchi, D. (2006). «Nutraceuticals and functional foods regulations in the United States and around the world». En: *Toxicology* 221, págs. 1-3.
- Balboa, E.M., E. Conde, A. Moure, E. Falqué y H. Domínguez (2013). «*In vitro* antioxidant properties of crude extracts and compounds from brown algae». En: *Food Chemistry* 138, págs. 1764-1785.
- Bautista, M.N., C. Lavilla-Pitogo, P.F. Subosa y E.T. Benigno (1994). «Aflatoxin B1 contamination of shrimp feeds and its effect on growth and hepatopancreas of preadult *Penaeus monodon*». En: *Journal of the Science of Food and Agriculture* 65, págs. 5-11.
- Bell, T.A. y D.V. Lightner (1988). *A handbook of normal Penaeid shrimp histology*. Ed. por World Aquaculture Society. Lawrence: Allen Press, Inc.

- Berteau, O. y B. Mulloy (2003). «Sulfated fucans, fresh perspectives: structures, functions, and biological properties of sulfated fucans and an overview of enzymes active toward this class of polysaccharide». En: *Glycobiology* 13 (6), 29R-40R.
- Bertuche, D. y C. Fischbach (1998). *Respecto del manejo de la pesquería de langostino patagónico (Pleoticus muelleri) en el área sur del Golfo an Jorge en 1997/1998*. Inf. téc. 72/98. INIDEP.
- Bertuche, D., C. Fischbach, M.I. Iorio y M. Fernández (1996). *La pesquería del langostino patagónico en 1996*. Inf. téc. 94/96. INIDEP.
- Bioeconomic model for the Argentine shrimp (Pleoticus muelleri) fishery of the San Jorge gulf, Argentina* (1987), págs. 395-419.
- Bertuche, D.A., D.R. Wyngaard, D.R. Hernández, H. Hack y H.J. Abal (1986). «Bioeconomic model for the Argentine shrimp (*Pleoticus muelleri*) fishery of the San Jorge Gulf, Argentina.» En: *Congreso latinoamericano de investigación operativa e ingeniería de sistemas, Chile*, págs. 52-78.
- Biagini, G., D. Sala e I. Zini (1995). «Diethyldithiocarbamate, a superoxide dismutase inhibitor, counteracts the maturation of ischemic-like lesions caused by endothelin-1 intrastriatal injection». En: *Neuroscience Letters* 90.3, págs. 212-216.
- Binsan, W., S. Benjakul, W. Visessanguan, S. Roytrakul, M. Tanaka y H. Kishimura (2008). «Antioxidative activity of Mungoong, an extract paste, from the cephalothorax of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*)». En: *Food Chemistry* 106, págs. 185-193.
- Blasko, A. et al. (2008). «Effect of polar and non-polar carotenoids on *Xanthophyllomyces dendrorhous* membranes by EPR». En: *European Biophysics Journal* 37 (7), págs. 1097-1104. DOI: [10.1007/s00249-008-0289-9](https://doi.org/10.1007/s00249-008-0289-9).
- Bocanegra, A., S. Bastida, J. Benedí, S. Ródenas y F.J. Sánchez-Muniz (2009). «Characteristics and nutritional and cardiovascular-health properties of seaweeds». En: *Journal of Medicinal Food* 12, págs. 236-258.
- Bold, H.C. y M.J. Wynne (1985). *Introduction to the algae: Structure and reproduction*. 2.<sup>a</sup> ed. Prentice-Hall Inc.
- Borrer, S. y A.L. Lawrence (1989). «Effects of lipids and cellulose on the digestibility of penaeid shrimp diets». En: *Journal of the World Aquaculture Society*, 20:18.
- Boschi, E.E. (1986). «La pesquería del langostino patagónico». En: *Cuaderno de redes* 20, págs. 19-26.
- Boschi, E.E., D Bertuche, J. Wyngaard, M.I. Iorio y J.L. Swidzinski (1984). «La Argentina: país camaronero. Desarrollo actual de la pesquería patagónica del langostino». En: *Informe Técnico, INIDEP*, págs. 1-22.
- Boschi, E.E. y M.A. Gavio (2005). «On the distribution of decapod crustaceans from the Magellan Biogeographic Province and the Antarctic region». En: *Scientia Marina* 69, págs. 195-200.
- Boschi, E.E. y M. Mistakidis (1966). *Resultados preliminares de las campañas de pesca exploratoria del langostino and el camarón en Rawson, 1962-1963*. CARPAS. Inf. téc. 6. INIDEP, págs. 1-15.
- Boschi, E.E. y M.A. Scelzo (1971). *Últimos resultados de las investigaciones sobre los peneidos comerciales de la Argentina (Migraciones, Campañas exploratorias and Cultivos)*. CARPAS. Inf. téc. 4. INIDEP.
- (1979). «El cultivo de camarones comerciales peneidos en la Argentina y la posibilidad de su producción en mayor escala». En: *Advances in Aquaculture*. Ed. por T.V.R. Pillay y W.A. Dill. Fishing News Books Ltd., págs. 268-270.
- Bray, W.A., A.L. Lawrence y J.R. Leung-Trujillo (1994). «The effect of salinity on growth and survival of *Penaeus vannamei*, with observation on the interaction of IHHN virus and salinity». En: *Aquaculture* 122, págs. 133-146.

- Britton, G. (14 de nov. de 2008). *Carotenoids*. Birkhäuser Basel. URL: <http://www.ebook.de/de/product/8897749/carotenoids.html>.
- Britton, G., S. Liaaen-Jensen y H. Pfander (2004). *Carotenoids Hand Book*. Basel, Switzerland: Birkhäuser.
- Brown, P.B., E.H. Robinson y A.E. Clark (1989). «Apparent digestible energy coefficients and associative effects in practical diets for red swamp crayfish». En: *Journal World Aquaculture Society* 20, págs. 122-126.
- Buccolo, G. y H David (1973). «Quantitative determination of serum triglycerides by the used of enzymes». En: *Clinical Chemistry* 19, págs. 476-482.
- Burtin, P. (2003). «Nuritional value of seaweeds». En: *J. Agric. Food Chem.* 2, págs. 498-503.
- Caceci, T., K.F. Neck, D.H. Lewis y R.F. Sis (1988). «The effect of salinity on growth and survival of *Penaeus vannamei*, with observation on interaction of IHNV virus and salinity.» En: *Aquaculture* 122, págs. 133-146.
- Camargo, J.A. y A. Alonso (2006). «Ecological and toxicological effects of inorganic nitrogen pollution in aquatic ecosystems: A global assessment». En: *Environment International* 32, págs. 831-849.
- Campos Miranda-Filho, K., G. Lopes Leaes Pinho, W. Wasielesky Jr. y A. Bianchini (2009). «Long-term ammonia toxicity to the pink-shrimp *Farfantepenaeus paulensis*». En: *Comparative Biochemistry and Physiology* 150C, págs. 377-382.
- Casas-Valdez, M.C., G. Portillo-Clark, N. Águila- Ramírez, S. Rodríguez-Astudillo, I. Sánchez- Rodríguez y S. Carrillo-Domínguez. (2006). «Efecto del alga marina *Sargassum* spp. sobre las variables productivas y la concentración de colesterol en el camarón café, *Farfantepenaeus californiensis* (Holmes, 1900)». En: *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 41 (1), págs. 97-105.
- Casas, G. y M. Piriz (1996). «Surveys of *Undaria pinnatifida* (Laminariales, Phaeophyta) in Golfo Nuevo, Argentina». En: *Hydrobiologia* 326/327, págs. 213-215.
- Casas, G y E. Schwindt (2008). «Un alga japonesa en la costa patagónica». En: *Ciencia Hoy* 18 (107), págs. 31-39.
- Castro, R., M.C. Piazzon, I. Zarra, J. Leiro, M. Noya y J. Llamas (2006). «Stimulation of turbot phagocytes by *Ulva rigida* C. Agardh polysaccharides». En: *Aquaculture* 254, págs. 9-20.
- Chand, R.K. y P.K. Sahoo (2006). «Effect of nitrite on the immune response of freshwater prawn *Macrobrachium malcolmsonii* and its susceptibility to *Aeromonas hydrophila*». En: *Aquaculture* 258, págs. 150-156.
- Chen, J.C. y S.F. Chen (1992). «Effects of nitrite on growth and molting of *Penaeus monodon* juveniles». En: *Comparative Biochemistry and Physiology* 101, págs. 453-458.
- Chen, J.C. y S.Y. Cheng (1995). «Changes of oxyhemocyanin and protein levels in the hemolymph of *Penaeus japonicus* exposed to ambient nitrite». En: *Aquatic Toxicology* 33, págs. 215-226.
- Cheng, S.Y. y J.C. Chen (2002). «Study on the oxyhemocyanin, deoxyhemocyanin, oxygen affinity and acid-base balance of *Marsupenaeus japonicus* following exposure to combined elevated nitrite and nitrate». En: *Aquatic Toxicology* 61, págs. 181-193.
- Chew, B.P. (1995). «Antioxidant vitamins affect food animal immunity and health». En: *Journal of Nutrition* 125, 1804S-1808S.
- Chien, Y.H. y W.C. Shiau (2005). «The effects of dietary supplementation of algae and synthetic astaxanthin on body astaxanthin, survival, growth, and low dissolved oxygen stress resistance of kuruma prawn, *Marsupenaeus japonicus* Bate». En: *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 318, págs. 201-211.
- Chien, Y.H., C.H. Pan y B. Hunter (2003). «The resistance to physical stresses by *Penaeus monodon* juveniles fed diets supplemented with astaxanthin». En: *Aquaculture* 216, págs. 177-191.



- Clark, J.V. (1992). «Physiological responses of adult *Penaeus semisulcatus* (De Haan) to change in salinity». En: *Comparative Biochemistry and Physiology* 101A, págs. 117-119.
- Clifford, H.C. (1994). «El manejo de estanques camaroneros». En: *Memorias del Seminario Internacional de Camaronicultura en México*. Ed. por H. Zendejas. Mazatlán, Sinaloa, págs. 1-39.
- Cofrades, S., I. López-López, L. Bravo, C. Ruiz-Capillas, S. Bastida, M.T. Larrea y F. Jiménez-Colmenero (2010). «Nutritional and Antioxidant Properties of Different Brown and Red Spanish Edible Seaweeds». En: *Food Science and Technology International* 16 (5). ISSN: 1082-0132. DOI: [10.1177/1082013210367049](https://doi.org/10.1177/1082013210367049).
- Conchie, J. y E.G.V. Percival (1950). «Fucoidin part II. The hydrolysis of a methylated fucoidin prepared from *Fucus vesiculosus*». En: *Journal Chemical Society*, págs. 827-833.
- Cruz-Suárez, L.E., M. Tapia-Salazar, M.G. Nieto-López y D. Ricque-Marie (2007). «Harina de kelp». En: *Manual de ingredientes proteicos*. Ed. por T. García-Galano, H. Villarreal-Colmenares y J.L. J. Fenucci. EUDEM, págs. 248-260.
- (2009). «Use of seaweeds for shrimp nutrition: status and potential». En: *The rising tide. Proceedings of the Special Session on Sustainable Shrimp Farming*. Ed. por C.L. Browdy y D.E. Jory. Baton Rouge: World Aquaculture Society, págs. 147-163.
- Cuartas, E.I., A.C. Díaz y A.M. Petriella (2002). «Estudio morfológico e histológico del hepatopáncreas del langostino *Pleoticus muelleri* (Bate)(Crustacea, Penaeoidea)». En: *Revista de Investigación and Desarrollo Pesquero* 15, págs. 5-13.
- Cuartas, E.I., A.C. Díaz y A.M. Petriella (2003). «Modificaciones del hepatopáncreas del langostino *Pleoticus muelleri* (CRUSTACEA, PENAEOIDEA) por efecto de la salinidad». En: *Biociencias* 11 (1), págs. 53-59.
- Dai, F.J. y C.F. Chau (2017). «Classification and regulatory perspectives of dietary fiber». En: *journal of food and drug analysis* 25, págs. 37-42.
- Dall, W., B.J. Hill, P.C. Rothlisberg y D.J. Staples (1990). «Biology of the Penaeidae». En: *Advances in Marine Biology*. Ed. por J.H.S. Blaxter y A.J. Southward. Vol. 27. London, UK: Academic Press, pág. 489.
- De Silva, S.S. y D. Soto (2012). «El cambio climático y la acuicultura: repercusiones potenciales, adaptación y mitigación». En: *Consecuencias del cambio climático para la pesca y la acuicultura*. Ed. por K. Cochrane, C. De Young, D. Soto y T. Bahri. FAO Nutrition Meetings Report Series, págs. 169-228.
- Demetropoulos, C.L. y C.J. Langdon (2004). «Enhanced production of Pacific dulse (*Palmaria mollis*) for coculture with abalone in a land-based system: nitrogen, phosphorus, and trace metal nutrition». En: *Aquaculture* 235, págs. 433-455.
- Díaz, A. C. y J. L. Fenucci (2002). «Comparative evaluation of different animal protein source in juveniles of *Pleoticus muelleri* (Crustacea, Penaeoidea)». En: *Modern Approaches to the Study of Crustacea*. Ed. por E. Escobar-Briones y F. Alvarez. Kluwer Academy Plenum Publisher, págs. 75-78.
- Díaz, A. C., L. G. Sousa y A. M. Petriella (2010). «Functional cytology of the hepatopancreas of *Palaemonetes argentinus* (Crustacea, Decapoda, Caridea) under osmotic stress. Changes induced by the posterior acclimation to freshwater». En: *Brazilian Archives of Biology and Technology* 53 (3), págs. 599-608.
- Díaz, A. C., L.G. Sousa y A. Petriella (2006). «Morfología e histología del aparato digestivo en los diferentes estadios de vida de los camarones peneidos». En: *Estado actual y perspectivas de la nutrición de los camarones peneidos*. Ed. por C. Rosas, R. Wilson y E. Andreatta. Publidisa Mexicana S.A, págs. 10-26. ISBN: 970-3240-53-4.
- Díaz, A. C., S. Velurtas, S.N. Mendiara y J. L. Fenucci (2013). «Correlation between radical scavenging capacity and carotenoid profile during larval development of *Pleoticus muelleri*». En: *Invertebrate Reproduction and Development* 51 (1), págs. 43-48.



- Díaz, A.C., A.V. Fernández-Gimenez, S.N. Mendiara y J.L. Fenucci (2004). «Anti-oxidant Activity in Hepatopancreas of the Shrimp (*Pleoticus muelleri*) by Electron Paramagnetic Spin Resonance Spectrometry». En: *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, págs. 3189-3193.
- Díaz, H.F., C. Farfan, E. Sierra y A.D. Re (2001). «Effects of teperature and salinity fluctation on the ammonium excretion and osmoregulation of juveniles of *Penaeus vannamei* Boone». En: *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology* 34, págs. 93-104.
- Dillehay, T.D., C. Ramirez, M. Pino, M.B Collins, J Rossen y JD Pinot-Navarro (2008). «Monte Verde: seaweed, food, medicine and the peopling of South America». En: *Science* 320, págs. 784-789.
- Eckert, R., D. Randall y G. Agustine (1990). *Fisiología animal mecanismos y adaptaciones*. Edición Interamericana Mc Graw Hill.
- FAO (2001). *Food Insecurity: When people live with hunger and fear starvation. The state of food insecurity in the world 2001*. ISBN: 92-5-104628-X.
- (2005). *The State of Food Insecurity in the World 2004: Monitoring progress towards the World Food Summit and Millennium Development Goals*. FAO. ISBN: 92-5-105178-X. URL: <https://www.amazon.com/State-Food-Insecurity-World-2004/dp/925105178X?SubscriptionId=0JYN1NVW651KCA56C102&tag=techkie-20&linkCode=xm2&camp=2025&creative=165953&creativeASIN=925105178X>.
- (2016). *The State of World Fisheries and Aquaculture 2016 (Spanish): Contributing to Food Security and Nutrition for All*. Food & Agriculture Organization of the United Nations (FAO). ISBN: 978-92-5-309185-0. URL: <https://www.amazon.com/State-World-Fisheries-Aquaculture-Spanish/dp/9253091851?SubscriptionId=0JYN1NVW651KCA56C102&tag=techkie-20&linkCode=xm2&camp=2025&creative=165953&creativeASIN=9253091851>.
- FAO, FIDA y PMA (2015). *El estado de la inseguridad alimentaria en el mundo 2015. Cumplimiento de los objetivos internacionales para 2015 en relación con el hambre: balance de los desiguales progresos*.
- Fenucci J. L. Pisani, E., A. C. Díaz y S.M. Velurtas (2015). «Effect of Dietary Carotenoids on Argentine Red Shrimp Broodstock». En: *World Aquaculture* 46 (1), págs. 57-61.
- Fenucci, J. L., A. C. Díaz y A.V. Fernández-Gimenez (2009). «A review on the status of protein nutrition of Argentine penaeoid shrimp: Comparisons and contrasts within the Penaeidae. Proceedings of the Special Session on Sustainable Shrimp Farming». En: *The Rising Tide*. World Aquaculture Society, págs. 164-176.
- Fenucci, J. L. y A. Fernández Gimenez (2004). «Acción de las vitaminas en la dieta de los camarones penaeoideos. Memorias del VII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola». En: *Avances en Nutrición Acuícola VII*. Ed. por L.E. Cruz Suarez, D. Rick Marie, M.G. Nieto López, D. Villarreal, U. Scholz y M. González.
- Fenucci, J. L., M.I. Müller y A.M. Petriella (1981). «Efectos de la alimentación natural and artificial en el crecimiento del camaron *Artemesia longinaris* Bate». En: *Revista Latinoamericana de Acuicultura* 10, págs. 10-17.
- Fenucci, J. L., A.M. Petriella y M.I. Müller (1983). «Estudios sobre el crecimiento del camarón *Artemesia longinaris* Bate alimentados con dietas preparadas». En: *Contribución INIDEP* 424, págs. 1-14.
- Fenucci, J.L., Z. Zein-Eldin y A.L. Lawrence (1980). «The nutritional response of two penaeid species to various levels of squid meal in a prepared feed.» En: *Journal of the World Aquaculture Society* 11, págs. 403-409.

- Fernández Gimenez, A.V., A.C. Díaz, M.S. Velurtas y J.L. Fenucci (2009). «In vivo and in vitro protein digestibility of formulated feeds for *Artemesia longinaris* (Crustacea, Penaeidae)». En: *Brazilian Archives of Biology and Technology* 52 (6), págs. 1379-1386.
- Fernández Gimenez, A.V., A.C. Díaz, S.M. Velurtas, A.M. Petriella y J.L. Fenucci (2008). «Effects of different dietary vitamin A levels in the red shrimp *Pleoticus muelleri* (Bate, 1888) (Decapoda, Solenoceridae)». En: *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 43 (3), págs. 483-490.
- Finey, D.J. (1971). *Probit analysis*. Cambridge University Press.
- Fischbach, C., J. De la Garza y D. Bertuche (2006). *La pesquería del langostino patagónico en el período 1991-2005*. Inf. téc. 03/06. INIDEP.
- Fischbach, C.E. y D.A. Bertuche (2016). *Pesquería del langostino *Pleoticus muelleri*. La temporada del año 2015*. Inf. téc. 007. INIDEP.
- Flores, M., F. Díaz, A. D. Medina R. and Re y A. Licea (2007). «Physiological, metabolic and haematological responses in white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) juveniles fed diets supplemented with astaxanthin acclimated to low-salinity water». En: *Aquaculture Research* 38, págs. 740-747.
- Frances, J, L. Allan Geoff y B.F. Nowak (1998). «The effects of nitrite on the short-term growth of silver perch *Bidyanus bidyanus*». En: *Aquaculture* 163, págs. 63-72.
- García-Galeano, T. (1997). *La investigación científica de peneidos de Iberoamérica*. Ed. por J.V. Calderon, F. Magallón, E. Andreatta y R. Sánchez Sánchez. La Paz, B.C.S.: CIB-NOR. Cap. Estado del arte de la investigación científica en nutrición de peneidos.
- Gómez-Ordóñez, E. y P. Rupérez (2011). «FTIR-ATR spectroscopy as a tool for polysaccharide identification in edible brown and red seaweeds». En: *Food Hydrocolloids* 25, págs. 1514-1520. DOI: [10.1016/j.foodhyd.2011.02.009](https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.02.009).
- González-Peña, M.C., A.J. Anderson, D.M. Smith y G.S. Moreira (2002). «Effect of dietary cellulose on digestion in the prawn *Macrobrachium rosenbergii*». En: *Aquaculture* 211, págs. 291-303.
- Gupta, S. y N. Abu-Ghannam (2011). «Bioactive potential and possible health effects of edible brown seaweeds». En: *Trends in Food Science & Technology*. DOI: [10.1016/j.tifs.2011.03.011](https://doi.org/10.1016/j.tifs.2011.03.011).
- Gutiérrez Leyva, R. (2006). «Uso de harinas de *Macrocystis pyrifera* y *Sargassum* spp. en alimentos balanceados para el camarón *Litopenaeus vannamei*. Efectos sobre el crecimiento y la digestibilidad in vivo». Tesis de mtría. Instituto Politécnico Nacional. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas. URL: <http://repositoriodigital.ipn.mx/handle/123456789/14214> (visitado 10-12-2015).
- Hafting, J.T., A.T. Critchley, M.L. Cornish, S.A. Hubley y A.F. Archibald (2012). «On-land cultivation of functional seaweed products for human usage». En: *Journal of Applied Phycology* 24, págs. 385-392.
- Halliwell, B. y J.M.C. Gutteridge (2001). *Free radicals in Biology and Medicine*. Ed. por Oxford University Press. 3.<sup>a</sup> ed. New York.
- Harán, N.S., A.C. Díaz y J.L. Fenucci (2013). «Effects of dietary sterols on growth, survival, and midgut gland histology in juvenile prawns, *Artemesia longinaris* (Decapoda, Penaeidea)». En: *The Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh* 65 (1), págs. 751-578.
- Harán, N.S., J.L. Fenucci y A.C. Díaz (1992). «Efectos de la temperatura and la salinidad sobre el crecimiento and la supervivencia del camarón (*Artemesia longinaris*) and el langostino (*Pleoticus muelleri*)». En: *Frente marítimo* 11A, págs. 79-83.
- Hargreaves, J.A. (1998). «Nitrogen biogeochemistry of aquaculture ponds». En: *Aquaculture* 166, págs. 181-212. DOI: [10.1016/s0044-8486\(98\)00298-1](https://doi.org/10.1016/s0044-8486(98)00298-1).

- Hegazi, M.M., Z.I. Attia y O.A. Ashour (2010). «Oxidative stress and antioxidant enzymes in liver and white muscle of *Nile tilapia* juveniles in chronic ammonia exposure». En: *Aquatic Toxicology* 99, págs. 118-125.
- Hemmingson, J.A., R. Falshaw, R.H. Forneaux y K. Thompson (2006). «Structure and antiviral activity of the galactofucans extracted from *Undaria pinnatifida* (Phaeophyta)». En: *Journal of Applied Phycology* 18, págs. 185-193.
- Hernández R.M. and Bückle, R.L.F., E. Palacios y S.B. Barón (2006). «Preferential behavior of white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone 1931) by progressive temperature-salinity simultaneous interaction.» En: *Journal of Theoretical Biology* 31, págs. 565-572.
- Holdt, S.L. y S. Kraan (2011). «Bioactive compounds in seaweed: functional food applications and legislation». En: *Journal of Applied Phycology* 23 (3), págs. 543-597.
- Hong, M., L. Chen, J.G. Qin, X. Sun, E. Li, S. Gu y N. Yu (2009). «Acute tolerance and metabolic responses of Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) juveniles to ambient nitrite». En: *Comparative Biochemistry and Physiology* 149C, págs. 419-426.
- Hong, M., L. Chen, X. Sun, Gu. S., L. Zhang y L. Chen (2007). «Metabolic and immune responses in Chinese mitten-handed crab (*Eriocheir sinensis*) juveniles exposed to elevated ambient ammonia.» En: *Comparative Biochemistry and Physiology* 145C, págs. 363-369.
- Horwitz, William (2003). *Official Methods of Analysis of Aoac International, Revision 2, 2003*. Aoac Intl. ISBN: 8033989017. URL: <https://www.amazon.com/Official-Methods-Analysis-International-Revision/dp/8033989017?SubscriptionId=0JYN1NVW651KCA56C102&tag=techkie-20&linkCode=xm2&camp=2025&creative=165953&creativeASIN=8033989017>.
- Hu, T., D. Liu, Y. Chen, J. Wu y S. Wang (2010). «Antioxidant activity of sulfated polysaccharide fractions extracted from *Undaria pinnatifida* in vitro». En: *International Journal of Biological Macromolecules* 46, págs. 193-198. DOI: [10.1016/j.ijbiomac.2009.12.004](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2009.12.004).
- Huang, J.H., S.G. Jiang, H.Z. Lin, F.L. Zhou y L. Ye (2008). «Effects of dietary highly unsaturated fatty acids and astaxanthin on the fecundity and lipid content of pond-reared *Penaeus monodon* (Fabricius) broodstock». En: *Aquaculture Research* 39, págs. 240-251. DOI: [10.1111/j.1365-2109.2007.01868.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2007.01868.x).
- Hughes, E.H. y E.B. Sherr (1983). «Subtidal food webs in a Georgia estuary: 134C analysis». En: *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 67, págs. 227-242.
- Hunter, J. y R.J. Feller (1987). «Immunological dietary analysis of two penaeid shrimp species from a South Carolina tidal creek». En: *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 107, págs. 61-70.
- Intanai, I., E.W. Taylor y N.M. Whintley (2009). «Effects of salinity on rates of protein synthesis and oxygen uptake in the post-larvae and juveniles of the tropical prawn *Macrobrachium rosenbergii* (De Man)». En: *Comparative Biochemistry and Physiology* 152A, págs. 372-378.
- Je J.Y. Park, P.J., E.k. Kim, J.S. Park, H.D. Yoon, K.R. Kim y C.B. Ahn (2009). «Antioxidant activity of enzymatic extracts from the brown seaweed *Undaria pinnatifida* by electron spin resonance spectroscopy». En: *Food Science and Technology* 42, págs. 874-878.
- Jensen, F.B. (2003). «Nitrite disrupts multiple physiological functions in aquatic animals». En: *Comparative Biochemistry and Physiology* 135A, págs. 9-24. DOI: [10.1016/S1095-6433\(02\)00323-9](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(02)00323-9).
- Jhonson, P.T. (1980). *Histology of the blue crab, Callinectes sapidus. A model for the Decapoda*. Praeger Publ.
- Jones, J.M. (2014). «CODEX-aligned dietary fiber definitions help to bridge the 'fiber gap'». En: *Nutrition Journal* 13 (34), págs. 1-10.

- Joseph, A y R. Philip (2007). «Acute salinity stress alters the heamolymph metabolic profile of *Penaeus monodon* and reduces inmunocompetence to white spot syndrome virus infection». En: *Aquaculture* 272, págs. 87-97.
- Ju, Z.Y., I.P. Forster y G.D. Warren (2010). «Effects of supplementing bioactive compounds to a formulated diet on sensory compounds and growth of shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931)». En: *Aquaculture Research* 41, págs. 1421-1431.
- Kadam, S.U., B.K. Tiwari y C.P. O'Donnell (2013). «Application of Novel Extraction Technologies for Bioactives from Marine Algae». En: *Journal of agricultural and food chemistry* 61, págs. 4667-4675.
- Kang, K., Y. Park, J.H. Hye, H.K. Seong, G.L. Jeong y H.C. Shin (2003). «Antioxidative properties of brown algae polyphenolics and their perspectives as chemopreventive agents against vascular risk factors». En: *Archives of Pharmacal Research* 26, págs. 286-293.
- Kraan, S. (2012). «Algal Polysaccharides, Novel Applications and Outlook». En: *Carbohydrates - Comprehensive Studies on Glycobiology and Glycotechnology*. Ed. por C.F. Chang. InTech. Cap. 22, págs. 489-532.
- Kuda, T., T. Kunii, H. Goto, T. Suzuki y T. Yano (2007). «Varieties of antioxidant and antibacterial properties of *Ecklonia stolonifera* and *Ecklonia kurome* products harvested and processed in the Noto Peninsula». En: *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 103, págs. 900-905.
- Kuhn, D. D., S. A. Smith, G. D. Boardman, M. W. Angier, L. Marsh y Jr. Flick G. J. (2010). «Chronic toxicity of nitrate to Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*: Impacts on survival, growth, antennae length, and pathology». En: *Aquaculture* 309, págs. 109-114.
- Kumaraguru Vasagam, K.P., T. Balasubramanian y R. Venkatesan (2007). «Apparent digestibility of differently processed grain legumes, cow pea and mung bean in black tiger shrimp, *Penaeus monodon* Fabricius and associated histological anomalies in hepatopancreas and midgut». En: *Animal Feed Science and Technology* 132, págs. 250-266.
- Lemaire, P. y D.R. Livingstone (1993). «Pro-oxidant/antioxidant processes and organic xenobiotics interactions in marine organisms, in particular the flounder *Platichthys flexus* and mussels *Mytilus edulis*». En: *Trends in Comparative Biochemistry and Physiology* 1 (2), págs. 1119-1150.
- Lemos, D., V.N. Phan y G. Álvarez (2001). «Growth, oxygen consumption, ammoniac-N excretion, biochemical composition and energy content of *Farfantepenaeus paulensis* Perez-Farfante (Crustacea: Decapoda, Penaeidae) early postlarvae in different salinities». En: *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 261, págs. 55-74.
- Lester, L.J. y M.J.R. Pante (1992). «Penaeid temperature and salinity responses». En: *Marine shrimp culture principle practices*. Ed. por A.W. Fast y L.J. Lester. Amsterdam: Elsevier, págs. 515-534.
- Leupp, J.L., J.S. Caton, S.A. Soto-Navarro y G.P. Lardy (2005). «Effects of cooked molasses blocks and fermentation extract or brown seaweed meal inclusion on intake, digestion, and microbial efficiency in steers fed low-quality hay». En: *Journal of Animal Science* 83, págs. 2938-2945.
- Li, B., F. Lu, X. Wei y R. Zhao (2008). «Fucoidan: Structure and Bioactivity». En: *Molecules* 13, págs. 1671-1695. ISSN: 1420-3049. DOI: [0.3390/molecules13081671](https://doi.org/10.3390/molecules13081671). URL: <http://www.mdpi.org/molecules>.
- Li, E., X Wang, K. Chen, C. Xu, J.G. Qin y L. Chen (2017). «Physiological change and nutritional requirement of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* at low salinity». En: *Aquaculture* 9, págs. 57-75.



- Li, Erchao, Liqiao Chen, Ceng Zeng, Na Yua, Zequan Xiong, Xuefen Chen y Jian G. Qin (2008). «Comparison of digestive and antioxidant enzymes activities, haemolymph oxyhemocyanin contents and hepatopancreas histology of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, at various salinities». En: *Aquaculture* 274, págs. 80-86. URL: [www.elsevier.com/locate/aqua-online](http://www.elsevier.com/locate/aqua-online).
- Li, j., D. Zhu, J. Niu, S. Shen y G. Wang (2011). «An economic assessment of astaxanthin production by large scale cultivation of *Haematococcus pluvialis*». En: *Biotechnology Advances* 29 (6), págs. 568-574.
- Liaaen-Jensen, S. (1990). «Marine carotenoids-Selected topics». En: *New Journal of Chemistry* 14, págs. 747-759.
- (1998). «Carotenoids in Food Chain». En: *Carotenoids: Biosynthesis and Metabolism*. Ed. por G. Britton, S. Liaaen-Jensen y H. Pfander. Vol. 3. Basel, Switzerland: Birkhäuser, págs. 359-371.
- Liang, J., Y.-X. Tian, F. Yang, J.-P. Zhang y L. H. Skibsted (2009). «Antioxidant synergism between carotenoids in membranes. Astaxanthin as a radical transfer bridge». En: *Food Chemistry* 115, págs. 1437-1442.
- Liang, J., Y. Tian, F. Yang, J. Zhang y L. H. Skibsted (2008). «Antioxidant synergism between carotenoids in membranes. Astaxanthin as a radical transfer bridge». En: *Food Chemistry* 115, págs. 1437-1442.
- Liao, S. et al. (2012). «Effect of nitrite on immunity of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* at low temperture and low salinity». En: *Ecotoxicology* 21, págs. 1603-1608. DOI: [10.1007/s10646-012-0947-7](https://doi.org/10.1007/s10646-012-0947-7).
- Lin, S.C., C.H. Liou y J.H. Cheng (2000). «The role of the antennal glands in ion and body volume regulation of cannulated *Penaeus monodon* reared in various salinity conditions». En: *Comparative Biochemistry and Physiology* 127, págs. 121-129.
- Lin, Y.C y J.C. Chen (2003). «Acute toxicity of nitrite *Litopenaeus vannamei* (Boone) juveniles at different salinity levels». En: *Aquaculture* 224, págs. 193-201.
- Lockwood, A.P.M. (1967). *Aspects of the physiology of crustacea*. San Francisco: W.H. Freeman y Company.
- Lorenzon, S., P.G. Giulianini, S. Libralato, M. Martinis y E.A. Ferrero (2008). «Stress effect of two defferent transport systems on the physiological profiles of the crab *Cancer pagurus*». En: *Aquaculture* 278, págs. 156-163.
- Luo, Y., X. Wang, L. Ji e Y. Su (2009). «EPR detection of hydroxyl radical generation and its interaction with antioxidant system in *Carassius auratus* exposed to pentachlorophenol». En: *Journal of Hazardous Materials* 171, págs. 1096-1102.
- Mallatt, J. (1985). «Fish Gill Structural Changes Induced by Toxicants and Other Irritants: A Statistical Review». En: *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 42 (4), págs. 630-648. DOI: [10.1139/f85-083](https://doi.org/10.1139/f85-083).
- Mantel, L.H. (1983). *The Biology of Crustacea*. Vol. 5: *Internal anatomy and physiological regulation*. Ed. por D. Bliss. Academic Press.
- Maoka, T. (2009a). «Recent progress in structural studies of carotenoids in animals and plants». En: *Archives of Biochemistry and Biophysics* 483, pág. 191195.
- (2009b). «Structural studies of natural carotenoids by our research group during the three decade». En: *Carotenoid Science* 14, págs. 26-36.
- (2011). «Carotenoids in Marine Animals». En: *Marine Drugs* 9 (2), págs. 278-293. DOI: [10.3390/md9020278](https://doi.org/10.3390/md9020278).
- Maoka, T. y N. Akimoto (2008). «Natural product chemistry in carotenoid, some experimental techniques for structural elucidation and analysis of natural carotenoids». En: *Carotenoid Science* 13, págs. 10-17.

- Mark, L.W., P. Potin *et al.* (2016). «Algae as nutritional and functional food sources: revisiting our understanding». En: *Journal of Applied Phycology* 29, págs. 949-982. DOI: [10.1007/s10811-016-0974-5](https://doi.org/10.1007/s10811-016-0974-5).
- Mark, W., N. Hamid, T. Liu, J. Lu y W.L. White (2013). «Fucoidan from New Zealand *Undaria pinnatifida*: Monthly variations and determination of antioxidant activities». En: *Carbohydrate Polymers* 95, págs. 606-614.
- Markou, G. y E. Nerantzis (2013). «Microalgae for high-value compounds and bio-fuels production: A review with focus on cultivation under stress conditions». En: *Biotechnology Advances* 31 (8), págs. 1532-1542.
- Martin, J.P. y J.M. Cuevas (2006). «First record of *Undaria pinnatifida* (Laminariales, Phaeophyta) in Southern Patagonia, Argentina». En: *Biological Invasions* 8, págs. 1399-1402.
- Masson, I., A.C. Díaz y A.M. Petriella (2012). «Effect of salinity changes on the mid-gut gland of *Artemesia longinaris* (Decapoda, Penaeidae)». En: *Latin American Journal of Aquatic Research* 40 (2), págs. 358-366. DOI: [10.3856/vol40-issue2-fulltext-10](https://doi.org/10.3856/vol40-issue2-fulltext-10).
- Matsuno, T. (1989). «Animal carotenoids». En: *Carotenoids Chemistry and Biology*. Ed. por N.I. Krinsky, M.M. Mathews-Roth y R.F. Taylor. New York, USA: Plenum Press, págs. 59-74.
- (2001). «Aquatic animal carotenoids». En: *Fisheries Science* 67, págs. 771-789.
- Matsuno, T. y S. Hirao (1989). «Marine carotenoids». En: *Marine Biogenic Lipids, Fats, and Oils*. Ed. por R.G. Ackman. Vol. 1. CRC Press, págs. 251-388.
- Medeiros, Denis M. y Robert E. C. Wildman (11 de dic. de 2013). *Advanced Human Nutrition*. Jones y Bartlett Publishers, Inc. ISBN: 1284036669. URL: [http://www.ebook.de/de/product/21062177/denis\\_m\\_medeiros\\_robert\\_e\\_c\\_wildman\\_advanced\\_human\\_nutrition.html](http://www.ebook.de/de/product/21062177/denis_m_medeiros_robert_e_c_wildman_advanced_human_nutrition.html).
- Meiattini, F., L. Precipe, F. Bardelli, G. Giannini y P. Tarli (1978). «The 4-hydroxybenzoate/4-aminophenazone chromogenic system used in the enzymic determination of serum cholesterol». En: *Clinical Chemistry* 24, págs. 2161-2165.
- Meléndez-Martínez, A., IM. Vicario y F.J. Heredia (2007). «Pigmentos carotenoides: consideraciones estructurales y fisicoquímicas». En: *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 57 (2), págs. 109-117.
- Mendiara, S.N., R.P. Baquero, M.R. Katunar, A.Y. Mansilla y L.J. Perissinotti (2009). «Reaction of  $\beta$ -carotene with nitrite anion in a homogeneous acid system. An electron paramagnetic resonance and ultraviolet-visible study». En: *Applied Magnetic Resonance* 35, págs. 549-567.
- Menezes, S., L. Soares A.M.V.M. and Guilhermino y M.R. Peck (2006). «Biomarker responses of the estuarine brown shrimp *Crangon crangon* L. to non-toxic stressors: temperature, salinity and handling stress effects». En: *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 335, págs. 114-122.
- Meretta, P.E., C.V. Matula y G. Graciela Casas (2012). «Occurrence of the alien kelp *Undaria pinnatifida* (Laminariales, Phaeophyceae) in Mar del Plata, Argentina». En: *Aquatic Invasions Records* 1 (1), págs. 59-63.
- Mohamed, S., S.N. Hashim y h.A. Rahman (2012). «Seaweeds: A sustainable functional food for complementary and alternative therapy». En: *Trends in Food Science & Technology* 23, págs. 83-96.
- Al-Mohanna, S.Y. y J.A. Nott (1989). «B-cells and digestion in the hepatopancreas of *Penaeus semisulcatus* (Crustacea, Decapoda)». En: *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 66, págs. 403-414.
- Moore, M.N. (1985). «Cellular responses to pollutants». En: *Mar. Biol. Bull* 16 (4), págs. 134-139.

- Moral, M. y Martín-Hernández (11 de sep. de 2005). 'Sabemos realmente qué comemos? : alimentos transgénicos, ecológicos y funcionales. EUNSA. Ediciones Universidad de Navarra, S.A. ISBN: 8431323256. URL: [http://www.ebook.de/de/product/8435975/\\_sabemos\\_realmente\\_que\\_comemos\\_alimentos\\_transgenicos\\_ecologicos\\_y\\_funcionales.html](http://www.ebook.de/de/product/8435975/_sabemos_realmente_que_comemos_alimentos_transgenicos_ecologicos_y_funcionales.html).
- Mustafa, G.M. e Y.H. Nakagawa (1995). «Effects of algae meal as feed additive on growth, feed efficiency and body composition in red sea bream». En: *Fish. Sci.* 61, págs. 25-28.
- Naidoo, K., G. Maneveldt, K. Ruck y J.J. Bolton (2006). «A comparison of various seaweed based diets and formulated feed on growth rate of abalone in a land-based aquaculture system». En: *J. Appl. Phycol.* 18, págs. 437-443.
- Needham, J. (1957). «Factors affecting nitrogen excretion in *Carcinides maenas*». En: *Physiologia Comparata et Oecologia* 4, págs. 209-239.
- Niu, J., L.X. Tian, Y.J. Liu, H.J. Yang, C.X. Ye y W. Gao (2009). «Effect of Dietary Astaxanthin on Growth, Survival, and Stress Tolerance of Postlarval Shrimp, *Litopenaeus vannamei*». En: *Journal of the world aquaculture society* 40 (6), págs. 795-802.
- Niu, J, X. Chen et al. (2015). «Effects of different levels of dietary wakame (*Undaria pinnatifida*) on growth, immunity and intestinal structure of juvenile *Penaeus monodon*». En: *Aquaculture* 435, págs. 78-85. DOI: [10.1016/j.aquaculture.2014.08.013](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.08.013).
- O'Neill, A.N. (1954). «Degradative studies on fucoidan». En: *Journal of the American Chemical Society* 76, págs. 5074-5076.
- Olson, J.A. y N.I. Krinsky (1995). «Introduction: The colorful, fascinating world of the carotenoids: important physiologic modulators». En: *The FASEB Journal* 9, págs. 1547-1550.
- Patil, B.I y G.B.N. Chaiy (2010). «Antioxidant defenses and oxidative stress parameters in tissues of mud crab (*Scylla serrata*) with reference to changing salinity». En: *Comparative Biochemistry and Physiology* 151C, págs. 142-151.
- Palozza, P., E. Barone y C. Mancuso (2008). «The protective role of carotenoids against 7-keto-cholesterol formation in solution». En: *Molecular and Cellular Biochemistry* 309, págs. 61-68.
- Pan, C.H., Y.H. Chien y J.H. Cheng (2001). «Effects of light regime, algae in the water, and dietary astaxanthin on pigmentation, growth, and survival of black tiger prawn *Penaeus monodon* post-larvae». En: *Zoological Studies* 40, págs. 371-382.
- Pan, C.H., Y.H. Chien y B. Hunter (2003). «The resistance to ammonia stress of *Penaeus monodon* Fabricius juvenile fed diets supplemented with astaxanthin». En: *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 297, págs. 107-118. DOI: [0022-0981](https://doi.org/10.1016/S0022-0981(03)00098-1).
- Pante, M.J.R. (1990). «Influence of environmental stress on the heritability of molting frequency and growth rate of the penaeid shrimp, *Penaeus vannamei*». Tesis de maestría. Houston, TX, USA: University of Houston-Clear lake.
- Parisenti, J., L. Beira, V.L.C.G H. Tramonte, F. Ourique, C.C. da Silveira Brito y C.C. Moreira (2011). «Preference ranking of colour in raw and cooked shrimps». En: *International Journal of Food Science and Technology* 46, págs. 2558-2561.
- Peñaflorida, V.D. y N.V. Golez (1996). «Use of seaweed meals from *Kappaphycus alvarezii* and *Gracilaria heteroclada* as binders in diets of juvenile shrimp *Penaeus monodon*». En: *Aquaculture* 143, págs. 393-341.
- Péqueux, A. (1995). «Osmotic regulation in crustaceans». En: *Journal of Crustacean Biology* 15, págs. 1-60.
- Perazzolo, L.M., R. Gargioni, P. Ogliari y M.A.A. Barranco (2002). «Evaluation of some hemato-immunological parameters in the shrimp *Farfantepenaeus paulensis* submitted to environmental and physiological stress». En: *Aquaculture* 214, págs. 19-33.

- Piriz, M. y G. Casas (1994). «Occurrence of *Undaria pinnatifida* in Golfo Nuevo, Argentina». En: *Journal of Applied Phycology* 10, pág. 4.
- Plaza, M., A. Cifuentes y E. Ibáñez (2008). «In the search of new functional food ingredients from algae». En: *Trends in Food Science & Technology* 19 (1), págs. 31-39.
- Ponce Palafox, J, C.A. Martínez Palacios y L.G. Ross (1997). «The effects of salinity and temperature on the growth and survival rates of juveniles white shrimp *Penaeus vannamei* Boone 1931». En: *Aquaculture* 157, págs. 107-115.
- Ponce, N.M.A., C.A. Pujol, E.B. Damonte, M.L. Flores y C.A. Stortz (2003). «Fucoi-dans from the Brown seaweed *Adenocystis utricularis*: Extraction methods, antiviral activity and structural studies». En: *Carbohydrate Research* 338, págs. 153-165.
- Popper, Z.A. et al. (2011). «Evolution and Diversity of Plant Cell Walls: From Algae to Flowering Plants». En: *Annual Review of Plant Biology* 62, págs. 567-590.
- Prosdociimi, L. y M. Monsalvo (2017). *Informe 1er semestre*. Inf. téc. 06. Coordinación Gestión de Pesquerías - DNPP- Subsecretaría de Pesca y Acuicultura.
- Pu, J., P.J. Bechtel y S. Sathivel (2010). «Extraction of shrimp astaxanthin with flaxseed oil: Effects on lipid oxidation and astaxanthin degradation rates». En: *Biosystems Engineering* 107, págs. 364-371.
- Rabanal Atalaya, M. (2015). «Estudio del sistema de polisacáridos del alga parda *Dictyota dichotoma* and su actividad antiviral». Tesis Doctoral. Universidad Nacional de La Plata, Facultad de Ciencias Exactas.
- Rivera, G., F. Yoong, G. Riofrío, B. Reinoso, F. Hurtado y P. Massuh (2002). «Inclusión de harina de kelp (*Macrocystis pyrifera*) en alimentos balanceados para camarón». En: *Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura*, págs. 244-252. URL: [www.revista%20aquatic.%20com/civa2002](http://www.revista%20aquatic.%20com/civa2002) (visitado ).
- Romano, N. y C. Zeng (2009). «Subchronic exposure to nitrite, potassium and their combination on survival, growth, total haemocyte count and gills structure of juvenile blue wimmer crabs, *Portunus pelagicus*». En: *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72, págs. 1287-1295.
- Rosas, C., A. Bolongaro-Crevenna, A. Sánchez, G. Gaxiola, L. Soto y E. Escobar (1995). «Role of the digestive gland in energetic metabolism of *Penaeus setiferus*». En: *The Biological Bulletin* 189, págs. 168-174.
- Rupérez, P. y F. Saura-Calixto (2001). «Dietary fibre and physicochemical properties of edible Spanish seaweeds». En: *European Food Research and Technology* 212 (3), págs. 349-354.
- Sánchez-Rodríguez, M.A., E. Santiago-Osorio, L.A. Vargas y V.M. Mendoza-Núñez (2004). «Propuesta de un constructo para evaluar integralmente el estrés oxidativo». En: *Bioquímica* 29 (3), págs. 81-90.
- Scelzo, M.A. y E.E. Boschi (1975). «Cultivo del langostino *Hymenopenaeus muelleri* (Crustacea, Decapoda, Penaeidae)». En: *Physis* 34A (88), págs. 193-197.
- Schleder, D.D. et al. (2017). «Brown seaweeds as feed additive for white-leg shrimp: effects on thermal stress resistance, midgut microbiology, and immunology». En: *Journal of Applied Phycology* 29 (5), págs. 2471-2477.
- Seneriches-Abiera, M.L., F. Parado-Esteba y G.A. Gonzáles (2007). «Acute toxicity of nitrite to mud crab *Scylla serrata* (Forsk.) larvae». En: *Aquaculture Research* 38, págs. 1495-1499.
- Silva, E., N. Calazans, M. Soares, R. Soares y S. Peixoto (2010). «Effect of salinity on survival, growth, food consumption and haemolymph osmolality of the pink shrimp *Farfantepenaeus subtilis* (Pérez-Farfante, 1967)». En: *Aquaculture* 306, págs. 352-356.
- Silva, P.C., R.A. Woodfield, A.N. Cohen, L.H. Harris y J.H.R. Goddard (2002). «First report of the Asian kelp *Undaria pinnatifida* in the northeastern Pacific Ocean». En: *Biological Invasions* 4, págs. 333-338.



- Skibsted, L.H. (2012). «Carotenoids in Antioxidant Networks. Colorants or Radical Scavengers». En: *Journal of Agricultural and food Chemistry* 60, págs. 2409-2417.
- Skriptsova, A.V., N.M. Shevchenko, T.N. Zvyagintseva y T.I. Imbs (2010). «Monthly changes in the content and monosaccharide composition of fucoidan from *Undaria pinnatifida* (Laminariales, Phaeophyta)». En: *falta el journal* 22 (1), págs. 79-86.
- Sokal, R. y J. Rohlf (1995). *Biometry, the Principles and Practice of Statistics in Biological Research*. 3rd. New York: W.H. Freeman.
- Sowmya, R., K. Rathinaraj y N.M. Sachindra (2011). «An Autolytic Process for Recovery of Antioxidant Activity Rich Carotenoprotein from Shrimp Heads». En: *Marine Biotechnology* 13 (5), págs. 918-927.
- Spanjersberg, G., A. Roux y G. Caille (2006). «Composición cualitativa de la dieta del camarón *Artemesia longinaris* Bate, 1888 (Decapoda, Penaeidae) de Bahía Engaño (Chubut), Argentina». En: *Boletín del Instituto Español de Oceanografía* 22 (1-4), págs. 99-111. ISSN: 0074-0195.
- Stahl, W. y H. Sies (2003). «Antioxidant activity of carotenoids». En: *Molecular Aspects of Medicine* 24, págs. 345-351.
- Stern, S., A. Borut y D. Cohen (1984). «The effect of salinity and ion composition on oxygen consumption and nitrogen excretion of *Macrobrachium rosenbergii*». En: *Comparative Biochemistry and Physiology* 79A, págs. 271-274.
- Supamattaya, K., S. Kiriratnikom, M. Boonyaratpalin y L. Borowitzk (2005). «Effect of a *Dunaliella* extract on growth performance, health condition, immune response and disease resistance in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*)». En: *Aquaculture* 248, págs. 207-216.
- Suresh, A.V. (2006). «Shrimp feed cost reduction». En: *Aqua Feeds: Formulation and Beyond* 3 (1), págs. 15-17.
- Synytsya, A. *et al.* (2010). «Structure and antitumour activity of fucoidan isolated from sporophyll of Korean brown seaweed *Undaria pinnatifida*». En: *Carbohydrate Polymers* 81, págs. 41-48.
- Taboada, M.C., R. Millán y M.I. Miguez (2013). «Nutritional value of the marine algae wakame (*Undaria pinnatifida*) and nori (*Porphyra purpurea*) as food supplements». En: *Journal of Applied Phycology* 25, págs. 1271-1276.
- Tacon, A.G.J., J.J. Cody, L.D. Conquest, S. Divakaran, I.P. Forster y O.E. Decamp (2002). «Effect of culture system on the nutrition and growth performance of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) fed different diets». En: *Aquaculture Nutrition* 8 (2), págs. 121-137.
- Taylor, H.H. y E.W. Taylor (1992). «Gills and lung: The exchange of gases and ions». En: *Microscopic Anatomy of Invertebrates*. Vol. 10. Wiley-Liss, Inc, págs. 203-293.
- Trinder, P. (1969). «Determination of glucose blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor». En: *Annals of Clinical Biochemistry* 6, págs. 24-26.
- Troell, M., A.D. Roberstson, R.J. Anderson, J.J. Bolton, G. Maneveldt, C. Halling y T. Probyn (2006). «Abalone farming in South Africa: an overview with perspectives on kelp resources, abalone feed, potential for on-farm seaweed production and socioeconomic important». En: *Aquaculture* 257, págs. 266-281.
- Tseng, C.K. (1981). «Marine phycoculture in China». En: *International Seaweed Symposium* 10, págs. 123-152.
- Usov, A.I. y M.I. Bilan (2009). «Fucoidans -sulfated polysaccharides of brown algae». En: *Russian Chemical Reviews* 78 (8), págs. 785-799.
- Uwai, S. *et al.* (2006). «Genetic diversity in *Undaria pinnatifida* (Laminariales, Phaeophyceae) deduced from mitochondria genes- rigns and succession of introduced populations». En: *Phycologia* 45 (6), págs. 687-695.

- Valavanidis, A., T. Vlahogianni, M. Dassenakis y M. Scoullos (2006). «Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants». En: *Ecotoxicology and Environmental Safety* 64, págs. 178-189.
- Valente, L.M.P., A. Gouveia, P. Rema, J. Matos, E.F. Gomes e I.S. Pinto (2006). «Evaluation of three seaweeds *Gracilaria bursa-pastoris*, *Ulva rigida* and *Gracilaria cornea* as dietary ingredients in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles». En: *Aquaculture* 252, págs. 85-91.
- Velurtas, S.M., A.C. Díaz, A.V. Fernández-Gimenez y J.L. Fenucci (2011). «Influence of dietary starch and cellulose levels on the metabolic profile and apparent digestibility in penaeoid shrimp». En: *Latin American Journal of Aquatic Research* 39 (2), págs. 214-224. DOI: [10.3856/vol39-issue2-fulltext-3](https://doi.org/10.3856/vol39-issue2-fulltext-3).
- Verlaque, M. (2007). *Ecology of Undaria pinnatifida*. URL: <http://www.iucngisd.org/gisd/species.php?sc=68>.
- Villarreal, H. (2002). «Avances en la nutrición de *Cherax quadricarinatus*. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuicola». En: *Avances en Nutrición Acuicola VI*. Ed. por L.E. Cruz-Suárez, D. Rique-Marie, M. Tapia Salazar, M.G. Gaxiola-Cortés y N. Simoes, págs. 114-142.
- Vinuesa, J.H. (2005). «Distribución de crustáceos decápodos and estomatópodos del golfo San Jorge, Argentina». En: *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 40 (1), págs. 7-21.
- Vishchuk, O.S., S.P. Ermakova y T.N. Zvyagintseva (2011). «Sulfated polysaccharides from brown seaweeds *Saccharina japonica* and *Undaria pinnatifida*: isolation, structural characteristics, and antitumor activity». En: *Carbohydrate Research* 346, págs. 2769-2776.
- Vo, T.S. y S.K. Kim (2013). «Fucoidans as a natural bioactive ingredient for functional foods». En: *Journal of Functional Foods* 5 (1), págs. 16-27.
- Vogt, G. (1987). «Monitoring of environmental pollutants such as pesticides in prawn aquaculture by histological diagnosis». En: *Aquaculture* 67, págs. 157-163.
- (1990). «Pathology of midgut gland cells of *Penaeus monodon* postlarvae after *Leucaena leucocephala* feeding». En: *Diseases of Aquatic Organisms* 9 (1), págs. 45-61.
- W., Gao, Tian L., Huang T., Yao M., Hu W. y Xu Q. (2016). «Effect of salinity on the growth performance, osmolarity and metabolism-related gene expression in white shrimp *Litopenaeus vannamei*». En: *Aquaculture Reports* 4, págs. 125-129.
- Wade, N.M., J. Gabaudan y B. D. Glencross (2015). «A review of carotenoid utilisation and function in crustacean aquaculture». En: *Reviews in Aquaculture* 9, págs. 141-156. DOI: [10.1111/raq.12109](https://doi.org/10.1111/raq.12109).
- Wang, W., A. Wang e Y. Zhang (2006). «Effect of dietary higher level of selenium and nitrite concentration on the cellular defense response of *Penaeus vannamei*». En: *Aquaculture* 256, págs. 558-563.
- Wang, W.N., A.L. Wang, Y.J. Zhang, Z.H. Li, J.X. Wang y R.Y. Sun (2004). «Effects of nitrite on lethal and immune response of *Macrobrachium nipponense*». En: *Aquaculture* 232, págs. 679-686.
- Winkaler, E., A. Silva, H. Galido y C. Reis Martínez (2001). «Biomarcadores histológicos e fisiológicos para o monitoramento da saúde peixes de ribeiros de Londrina, Estado do Paraná». En: *Acta Scientiarum* 23 (2), págs. 507-514.
- Winston, G. W., G. E. Lemaire y R.F. Lee (2004). «Antioxidants and total oxyradical scavenging capacity during grass shrimp, *Palaemonetes pugio*, embryogenesis». En: *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology & Pharmacology* 139, págs. 281-288.
- Wyngaard, J.G. y D.A. Bertuche (1982). «Algunos aspectos de la biología pesquera del langostino (*Pleoticus muelleri*) de la Bahía Blanca y un análisis del desembarco

- comercial periodo 1955-1979». En: *Revista de investigación de desarrollo pesquero* 3, págs. 59-76.
- Yildiz, H.Y. y A.C. Karasu Benli (2004). «Nitrite toxicity to crayfish, *Astacus leptodactylus*, the effects os sublethal nitrite exposure on hemolymph nitrite, total hemocyte counts, and hemolymph glucose». En: *Ecotoxicology and Environmental Safety* 59, págs. 370-375.
- Zhang, C. y A. Wen (2012). «Different of chlorogenic acid doses on growth performance, non-specific immunity and antioxidant function of *Cyprinus carpio* var. Jian». En: *Journal of Sichuan Agricultural University* 1, págs. 92-97.
- Zhang, J., Y.J. Liu, L-X. Tian, H.J. Yang, G.Y. Liang, Y.R. Yue y D.H. Xu (2013). «Effects of dietary astaxanthin on growth, antioxidant capacity and gene expretion in Pacific shrimp *Litopeneus vannamei*». En: *Aquaculture Nutrition* 19, págs. 917-927. DOI: [10.1111/anu.12037](https://doi.org/10.1111/anu.12037).
- Zhang, J., Y.J. Liu, L.X. Tian, H.J. Yang, G.Y. Liang, Y.R. Yue y D.H. Xu (2014). «Effects of dietary astaxanthin on growth, antioxidant capacity and gene expression in Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*». En: *Aquaculture Nutrition* 19, págs. 917-927.